Chromosoma (Berl.) 10, 461—481 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Wien

SPINDELDEFEKTE, MANGELHAFTE ZELLWANDBILDUNG UND ANDERE MEIOSESTÖRUNGEN BEI POLYPLOIDEN SIPPEN DES ACHILLEA MILLEFOLIUM-KOMPLEXES

(ZUR PHYLOGENIE DER GATTUNG ACHILLEA, III.)

Von

FRIEDRICH EHRENDORFER

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. März 1959)

Inhaltsübersicht

Seite

A. Einleitung 461
B. Material und Methodik 462
C. Spezieller Teil 462
1. Tetraploide Sippen 463
a) *Achillea roseo-alba* (4x) S. 463. — b) *Achillea collina* S. 465. — c) *Achillea lanulosa* S. 466.
2. Hexaploide Sippen 467
a) *Achillea millefolium* s. str. S. 467. — b) *Achillea borealis* S. 471. — c) *Achillea distans* S. 471.
3. Oktoploide Sippen 472
a) *Achillea pannonica* S. 472. — b) *Achillea monticola* S. 472.
D. Allgemeiner Teil und Diskussion 473
1. Störungen der Chromosomenreproduktion 473
2. Spindelstörungen und Restitutionskernbildung 474
3. Störungen der Zellwandbildung 476
4. Störungen der meiotischen Chromosomenpaarung 477
5. Zusammenhänge zwischen den Einzelkomponenten des Störungsbildes . 478
Zusammenfassung 479
Literatur 481

A. Einleitung

Die vorliegende Arbeit stellt eine Fortsetzung der Beiträge über Störungen der Pollenmeiose bei Sippen aus dem Verwandtschaftskreis der *Achillea millefolium* dar. Während im Beitrag II (EHRENDORFER 1959b) die Störungen bei den Diploiden behandelt wurden, sollen nunmehr die entsprechenden Defekte bei den Polyploiden zur Darstellung gelangen. Die Fragestellung konzentriert sich dabei besonders darauf, die Störungssyndrome herauszuarbeiten und Kontraste im Vergleich mit den Diploiden zu belegen. Die Bedeutung des Störungsbildes für eine Interpretation der Mikro-Evolution wurde dabei besonders berücksichtigt und soll in einem weiteren Beitrag IV (EHRENDORFER 1959d) gesondert dargestellt werden. Wegen des allgemeinen Rahmens der laufenden *Achillea*-Studien muß auf Beitrag II verwiesen werden.

B. Material und Methodik

Im Hinblick auf Material und Methodik gelten die gleichen Voraussetzungen wie für Beitrag II, wobei allerdings hinzugefügt werden muß, daß sich die cytologischen Analysen der Polyploiden über einen größeren Zeitraum (1952—1958) erstrecken und auch Pflanzen von den Kulturflächen des Carnegie-Institutes in Stanford, Kalifornien (SUI) verwendet wurden.

Bei den Abbildungen wurde zur Kennzeichnung der Multivalente Kreuzschraffur verwendet, nur einzeln herausgezeichnete Multivalente sind weiß belassen. Durch chromosomenstrukturelle Umbauten betroffene Elemente sind schwarz angelegt, Univalente und deren Spalthälften wurden einfach schraffiert.

C. Spezieller Teil

Die in der vorliegenden Arbeit behandelten Kleinarten repräsentieren eupolyploide (4x, 6x, 8x) Abkömmlinge von diploiden Basissippen mit der Grundzahl $x = 9$, z. B. von *A. setacea* W. K. und *A. asplenifolia* VENT. Alle diese Sippen gehören zum *A. millefolium*-Komplex im weiteren Sinn; für die noch nicht eindeutig erkannten di- bzw. tetraploiden Vorläufer der hexaploiden *A. distans* W. K. (= *A. tanacetifolia* ALL. non MILL.) gilt diese Feststellung vorläufig allerdings nur mit einer gewissen Reserve. — Die folgenden kurzen Angaben über die phylogenetischen Beziehungen der Diploiden und Polyploiden dieses Komplexes werden bei EHRENDORFER (1959f) und in weiteren Arbeiten eingehend dargestellt und belegt werden.

Von den europäischen Sippen des *A. millefolium*-Komplexes ist die weitverbreitete, kontinentale, mittel- und osteuropäische, tetraploide A. *collina* BECKER durch Alloploidie aus *A. setacea* und *A. asplenifolia* entstanden und konnte aus diesen diploiden Basissippen auch experimentell hergestellt werden. Aus den selbständigen diploiden hybridogenen Introgressions-Populationen *A. asplenifolia* $\gtrless$ *A. setacea* (*A. roseoalba* EHRENDF.) mit Verbreitungsschwergewicht in Norditalien und am Alpen-Innenrand sind mehrfach und polyphyletisch tetraploide Populationen hervorgegangen. — Die weitverbreitete subatlantische, west-, mittel- und nordeuropäische, hexaploide *A. millefolium* L. s. str. ist offensichtlich relativ alt und wahrscheinlich unter Beteiligung einer mesophilen, sehr feinblättrigen, zentralasiatischen Diploiden entstanden; zu der tetraploiden *A. collina* besteht also keine unmittelbare phylogenetische Beziehung, wenn auch im Kontaktraum 5x-Hybriden und Rückkreuzungsindividuen eine Abgrenzung der beiden Kleinarten erschweren (SCHNEIDER 1958). — Extrem breitblättrige hexaploide Primitivformen der *A. distans* kommen heute nur mehr in Reliktgebieten, vor allem in den Südwestalpen, am Balkan und in Siebenbürgen vor. Sehr weit verbreitet sind dagegen besonders im Südalpenbereich und am Alpenostrand völlig selbständig gewordene hybridogene Mischpopulationen mit *A. millefolium*. Für diesen Hybridenschwarm wird

u. a. der Name *A. stricta* SCHL. angewandt; in der vorliegenden Arbeit wird er vorläufig noch unter *A. distans* subsummiert. — *A. millefolium* s. str. war offensichtlich auch an der Entstehung der untereinander kaum näher verwandten europäischen Oktoploiden des Formenkreises beteiligt. Die kontinentale, südosteuropäische Sippe ist *A. pannonica* SCHEELE, die in den Pyrenäen und deren Vorland vorkommende kann vorläufig als *A. monticola* MARTR. bezeichnet werden.

Die nordamerikanischen Sippen des *A. millefolium*-Komplexes können auf die beiden, sonst nicht weiter unterscheidbaren Cyto-Species *A. lanulosa* NUTT. (tetraploid) und A. *borealis* BRONG. (hexaploid) aufgeteilt werden. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist die auf 3 Teilareale im westlichen Nordamerika beschränkte *A. borealis* polyphyletisch aus verschiedenen Tetraploiden entstanden. Ebenso wie in Europa ist auch in Nordamerika an den Arealgrenzen von Tetra- und Hexaploiden die Entstehung von hybridogenen Kontaktsäumen möglich.

1. Tetraploide Sippen

a) *Achillea roseo-alba* (4x). Bei diesen Tetraploiden handelt es sich um junge, durch Genomverdopplung aus einer selbständigen diploiden Introgressionssippe entstandene Polyploide mit lokaler Verbreitung (vgl. EHRENDORFER 1959a, f). Stichproben nicht eingerechnet, wurden 7 Individuen aus den Populationen Brentonico und Tiers (mittlere Südalpen) einer eingehenden Analyse der Pollenmeiose unterzogen.

Wie auf Grund der fast normalen Chromosomenpaarung der diploiden Ausgangssippe zu erwarten war, handelt es sich bei den mäßigen Meiosestörungen dieser jungen Tetraploiden vor allem um Multi- und Univalentbildung und ihre Folgen. Das Ausmaß der Multivalentrate ist allerdings im Vergleich zu einer autotriploiden *A. crithmifolia* (vgl. EHRENDORFER 1959b, S. 382) erstaunlich gering: Während bei dieser Anorthoploiden in *allen* PMZ 3—8 Trivalente auftreten ($M = 5{,}2$), liegen die entsprechenden Mittelwerte bei den verschiedenen Individuen der orthoploiden *A. roseo-alba* zwischen 0,05 und 0,35; d. h., daß nur in 5—35% der PMZ einzelne Multivalente auftreten. Schwankungen der Multivalentfrequenz finden sich u. a. auch bei verschiedenen Schwesterpflanzen aus Samen einer Mutterpflanze (Tiers, Serie 197) unter völlig gleichartigen Kultur- und Fixierungsbedingungen im Botanischen Garten der Universität Wien (HBV); Syndese und davon $\pm$ abhängige Multivalentfrequenz sind also offensichtlich idiotypisch und zumindest überwiegend genisch gesteuert.

Die inter-individuellen Verschiedenheiten der Syndeserate werden überlagert durch intra-individuelle Schwankungen. So sind etwa bei Pflanze 197-6 im Durchschnitt Ring- und Stab-Bivalente mit 2 bzw. 1 Chiasma im Verhältnis 48:52 verteilt; die intra-individuelle Amplitude

von PMZ zu PMZ reicht aber von 3 (2 Chiasmata) + 15 (1 Chiasma) bis zu 11 (2 Chiasmata) + 7 (1 Chiasma) (Werte aus 25 PMZ).

Die Multivalente treten bei den tetraploiden *A. roseo-alba*-Formen etwa in gleicher Zahl als Tri- und Quadrivalente in Erscheinung, wobei die üblichen ketten-, ring-, stielpfannen- bzw. ypsilonförmigen Figurationen vorkommen (Abb. 1a, b). Bei Individuen mit geringer Syndesefrequenz

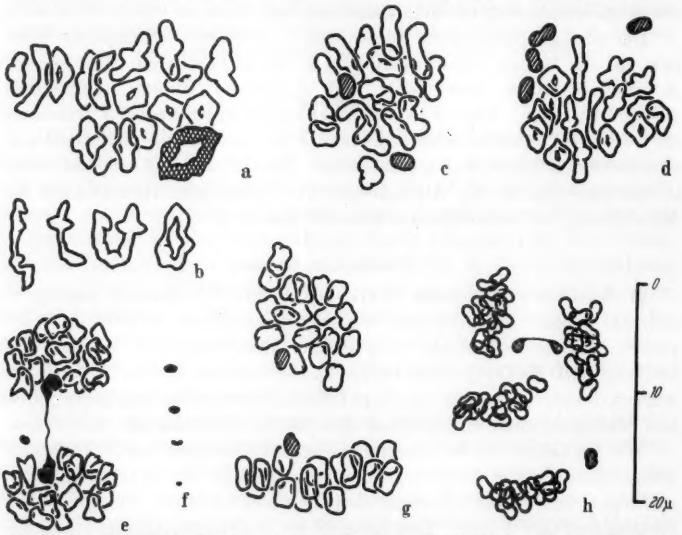


Abb. 1a—h. Tetraploide Sippen. *A. roseo-alba* (4x) (Tiers 197-6: a, b, g; 197-16: c; Brentonico, fix. Z: e, f, h) und *A. collina* (126-3: d): Störungen der Pollenmeiose. a Meta I mit 16 II + IV. b Multivalente (III, IV). c und d Meta I mit ungepaarten Homologen, 17 II + 2 I bzw. 16 II + 4 I. e Ana I mit Chromatid-Brücke und zugehörigem Fragment. f Weitere Fragmente aus Ana I-Brücken der gleichen Pflanze. g Ungleichmäßige Verteilung der Elemente aus Ana I, Meta II mit 18 II/2 + I/2 und 17 II/2 + I/2. h Telo II mit Eliminierung bzw. verspäteter Teilung (und Centromer-Zerrung) zweier Univalenthälften

bleiben, wenn auch recht selten, einzelne Homologe ungepaart: 17 II + 2 I (Abb. 1c).

Da sich die Univalente im Zuge der Pollenmeiose fast immer nur einmal und zwar meist schon frühzeitig während der Ana I teilen (vgl. SCHNEIDER 1958, EHRENDORFER 1959b), sind besonders bei Individuen mit hoher Multivalentfrequenz (und damit relativ häufiger Figuration III + I) nachhinkende Elemente, vor allem in Ana II verbreitet. Diese Elemente werden in Telo II meist als Mikro-Nuclei eliminiert. Der Anteil von Tetraden mit Mikro-Nuclei wurde bei drei mäßig gestörten Pflanzen mit 12,5—13,5% bestimmt. Infolge ungleichmäßiger Verteilung von Multi- und Univalenten (Abb. 1g), Unregelmäßigkeiten in

der Teilung der Univalente (Abb. 1h: Teilung einer Univalent-Spalthälfte in Ana II mit Zerrung des Centromers) und vor allem auch infolge Eliminierung von Univalenten als Mikro-Nuclei kommt es zur Bildung aneuploider Gameten. — Trotz allen diesen Störungen sind optisch defekt erscheinende Pollenkörner zum Zeitpunkt der Öffnung der Antheren nur zu einem ganz geringen Prozentsatz vorhanden. — Im Gegensatz zu den Hexaploiden (vgl. S. 467 ff.), konnten bei Tetraploiden bisher allerdings noch keine aneuploiden Individuen festgestellt werden.

Störungen der Chromosomenreproduktion sind im Vergleich mit den diploiden bei den tetraploiden *A. roseo-alba*-Formen deutlich reduziert. Von den 7 analysierten Individuen wurden nur bei einem (Tiers 197-16) vereinzelte freie Chromosomen- bzw. Isochromatid-Fragmente in Meta I festgestellt, bei 4 weiteren finden sich vereinzelte Ana I- (und Ana II-) Brücken, z. T. mit zugehörigen U-förmigen Isochromatid-Fragmenten (Abb. 1e und f); die Fragmente sind teilweise noch den Brücken angeheftet. Bei der mäßig stark gestörten Pflanze Tiers 197-16, vielleicht auch noch bei Tiers fix. 1, ergibt ein Vergleich der Chromosomenzahlen verschiedener PMZ schwache intra-individuelle Aneuploidie. — Damit ist, wenn auch nur andeutungsweise, das für diploide Achilleen so bezeichnende Störungssyndrom II gegeben: spontane Chromosomenaberrationen und Folgen von somatischer Non-Disjunction in prämeiotischen Mitosen (vgl. EHRENDORFER 1959b). Die inter-individuellen Verschiedenheiten in der Intensität der Störungen trotz gleicher Kultur- und Fixierungsbedingungen machen auch hier die Annahme einer idiotypischen Steuerung notwendig.

Störungen des Spindelapparates und defekte Zellwandbildung wurden bei unserer tetraploiden Hybridsippe bisher nicht festgestellt.

Die Größe der Chromosomen ist bei tetraploider *A. roseo-alba* gegenüber den entsprechenden diploiden Formen (vgl. EHRENDORFER 1959b) deutlich reduziert.

b) ***Achillea collina.*** Im Gegensatz zu den tetraploiden *A. roseo-alba*-Formen handelt es sich bei *A. collina* um eine weitverbreitete, ziemlich einheitliche und offensichtlich relativ alte Allopolyploide. Die 23 genauer analysierten Individuen stammen aus Bayern, dem südlichen, mittleren und östlichen Alpenraum, Steiermark, Niederösterreich, dem Burgenland und den nördlichen Balkanländern.

Störungen der Pollenmeiose infolge Multi- und Univalentbildung sind wesentlich seltener als bei den unter a) besprochenen jungen Tetraploiden. Bei über der Hälfte der untersuchten Wildformen konnte überhaupt *nur* normale Bivalentbildung (18 II) festgestellt werden; bei etwa 30% kommen vereinzelte Multivalente vor, bei etwa 10% ist umgekehrt die Syndesefrequenz so niedrig, daß einzelne ungepaarte

Homologe (17 II + 2 I, sehr selten auch 16 II + 4 I; vgl. Abb. 1c, d) in Erscheinung treten. Die Multivalente, überwiegend Quadrivalente, treten fast ausschließlich einzeln und in bis zu 10% der PMZ auf. Bei den in der Syndese gestörten Individuen finden sich meist Mikro-Nuclei aus eliminierten Univalenthälften.

Im Gegensatz zu den weitgehend normalen Wildformen weist die Syndese bei 2 genauer untersuchten, durch erzwungene Autogamie entstandenen Schwester-Individuen einer Inzuchtlinie (126-2 und -3) eine stärkere Schwankungsbreite auf. Bei 126-2 ist das Verhältnis von Bivalenten mit Ringfiguration und 2 Chiasmata zu Stabelementen mit 1 Chiasma von Diakinese bis Meta I (wobei sich keine nennenswerten Verschiebungen ergeben) im Durchschnitt (25 PMZ) so wie 41,6:58,4; bei 126-3 so wie 37,4:62,6. Bei 100 PMZ von 126-3 zeigen etwa 50% Abweichungen, bei etwa 35% finden sich Multivalente, bei etwa 15% ungepaarte Homologe (Abb. 1d); 126-2 hat in 25% der PMZ Multivalente; auch hier überwiegen Quadrivalente sehr stark. Eine weitere Zählung an einzelnen Meta I-Elementen ergibt bei 126-3 95,3% II, 3,3 IV (und III) sowie 1,6% ungepaarte Homologe. In den Interkinesen, besonders aber in den Tetraden treten Mikro-Nuclei in Erscheinung, infolge der ± regelmäßigen Verteilung der Quadrivalente allerdings in relativ geringfügigem Maß (126-2: 3,6%; 126-3: 9,3%). — Die klaren Unterschiede in der Intensität der Störungen zwischen den beiden Schwesterpflanzen 126-2 und -3 (gleichartige Kultur- und Fixierungsbedingungen im HBV) können als ein weiterer Hinweis auf die genische Steuerung der Syndese gelten.

Die Störungen der Chromosomenreproduktion treten bei der tetraploiden *A. collina* sehr stark zurück. Von den 23 untersuchten Individuen konnten nur bei 4 schwache Brückenbildung in Ana I und II — teilweise mit zugehörigen Fragmenten, terminale Chromatid-Kontakte in Ana I (und II?) — sowie ganz vereinzelt freie Fragmente in Meta I festgestellt werden. Bei einer Pflanze vom Balkan (sw Lipljan, fix. 15) wurden akzessorische Chromosomen festgestellt (vgl. EHRENDORFER 1959e).

Störungen des Spindelapparates scheinen bei *A. collina* nur ganz vereinzelt aufzutreten. Bloß bei einer Pflanze (Wien-Hietzing, fix. 5) wurden in Ana II schwache Unregelmäßigkeiten der Spindel mit ungleichzeitiger Bewegung der Elemente (Vorauseilen bzw. Nachhinken) beobachtet.

Die Größe der Chromosomen ist bei der tetraploiden *A. collina* im allgemeinen etwas geringer als bei den ebenfalls tetraploiden *A. roseo-alba*-Formen (vgl. Abb. 1a—d). Damit wird eine gewisse idiotypische Steuerung der Chromosomengröße erkennbar.

c) ***Achillea lanulosa.*** Der unter diesem Namen zusammengefaßte tetraploide Sippenkomplex in Nordamerika scheint noch weniger

störungsanfällig zu sein als *A. collina*. Hinsichtlich der Pollenmeiose analysiert wurden 51 Individuen, vorzüglich aus den westlichen Staaten der USA.

Bei etwa 75% der untersuchten Individuen konnten keine Multivalente bzw. Univalente festgestellt werden; sie fehlen hier vollständig oder sind infolge ihrer Seltenheit der Beobachtung entgangen. Im übrigen sind auch bei *A. lanulosa* — ebenso wie bei *A. collina* — Individuen mit verstärkter Syndese und vereinzelten Multivalenten, Tri- und Quadrivalenten häufiger als solche mit stark reduzierter Syndese und ungepaarten Homologen. Hinsichtlich der Unregelmäßigkeiten der Univalent- bzw. Multivalentverteilung sowie der Mikro-Nuclei-Bildung gelten die gleichen Angaben wie bei den oben besprochenen Sippen.

Nur bei einer Pflanze (Vera Cruz: SUI 4909-2) konnten Folgen von Chromosomenaberrationen beobachtet werden: bis in die Meta II persistierende Ana I-Brücken.

Defekte Zellwandbildung bei der Entstehung der Tetraden konnte bei SUI 5833-1 (British Columbia: White Cliff) festgestellt werden. Hier bilden sich die Zellwände bei einem Teil der PMZ nicht simultan, wie das für *Achillea* charakteristisch ist, sondern sukzedan.

2. Hexaploide Sippen

a) *Achillea millefolium* s. str. Von dieser weitverbreiteten und sicher relativ alten Polyploiden wurden 20 Individuen aus Island, Skandinavien, Frankreich, Deutschland, dem Alpenraum und dem nördlichen Appennin im Hinblick auf den Ablauf der Pollenmeiose untersucht.

Ebenso wie bei den Tetraploiden sind auch hier die Syndeseverhältnisse von Individuum zu Individuum verschieden. Bei etwa der Hälfte (11) der untersuchten Pflanzen wurden keine Multi- und Univalente beobachtet, 7 Pflanzen hatten Multivalente (Quadri- bzw. Tri- und Univalente, vgl. Abb. 2a und b) in bis zu 50% der PMZ, 2 Pflanzen waren durch das Vorkommen ungepaarter Homologer (Abb. 2c: sehr vereinzelte PMZ mit 25 II + 4 I) ausgezeichnet. Während das Verhältnis von ring- zu stabförmigen Bivalenten mit 2 bzw. 1 Chiasma bei den normalen Pflanzen etwa bei 1:2—3 und bei denen mit Multivalenten meist noch darüber liegt, erreicht es bei Individuen mit reduzierter Syndese 1:4 und weniger; so ist etwa bei Krailbachtal fix. 5 die Verteilung der Meta I-Elemente: Bivalente mit 2 Chiasmata 13,5%, mit 1 Chiasma 83,0% und ungepaarte Homologe 3,5% (25 PMZ). Stark verschiedene Syndese-Verhältnisse wurden u. a. auch bei Nachbarpflanzen aus ein und derselben Population festgestellt, wie etwa am Fundort Krailbachtal (Moselgebiet).

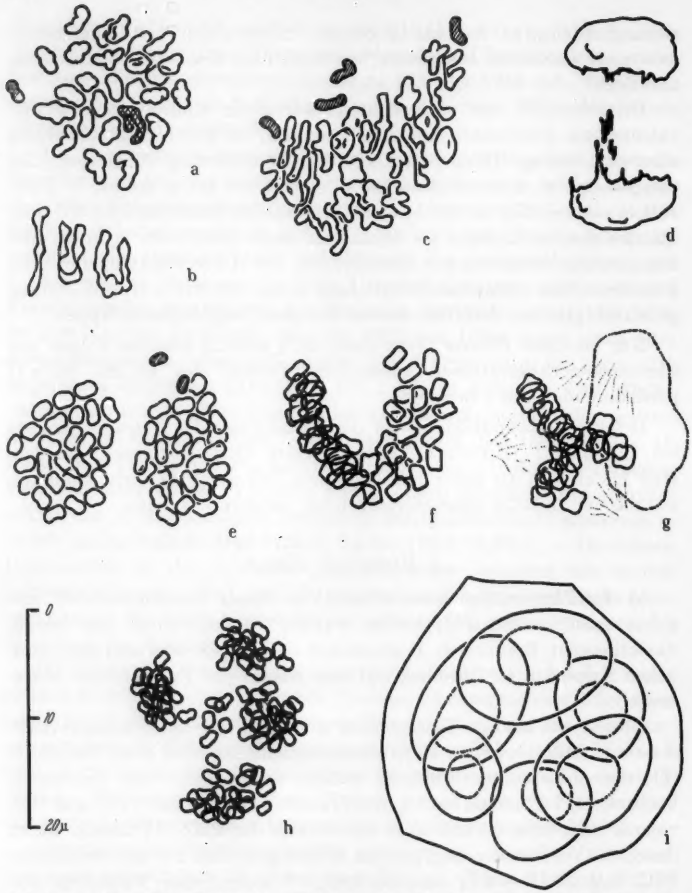


Abb. 2a—i. Hexaploide Sippen. *A. millefolium* s. str. (Pordoi, fix. 31: a, b; Krailbachtal, fix. 5: c; Lappland-Abisko SUI 3766-2: d, f, h, i) und *A. distans* (Mte. Tombea, fix. 15: e; Mte. Altissimo, fix. 20: g): Störungen der Pollenmeiose. a Meta I mit 25 II + III + I. b Multivalente (III, IV). c Meta I mit ungepaarten Homologen, 25 II + 4 I. d Elimination von Elementen in der Interkinese als Folge mangelhafter Ana I. e ungleichmäßige Verteilung der Elemente aus Ana I, Meta II mit 26 II/2 und 26 II/2 + 2 I/2. f Zusammenfließende Meta II-Platten als Folge von Restitutionskernbildung aus Telo I. g Tripolare frühe Ana II-Spindel (die zweite, normale frühe Ana II-Gruppe im Umriß). h Mangelhafte Spindelaktivität in Ana bis Telo II. i Sechskernige PMZ als Resultat multipolarer Spindelbildung in Ana bis Telo II

Durch unregelmäßige Verteilung der Multi- und Univalente (Abb. 2e: Meta II, Gruppe 1: 26; Gruppe 2: 27 + 2 vorzeitig getrennte Univalent-

hälften) und durch Nachhinken von bereits in Ana I geteilten Univalenten in Ana II entstehen in bekannter Weise aneuploide Gameten und Tetraden mit Mikro-Nuclei (vereinzelt auch mit selbständiger Zellwandbildung).

Chromosomenstrukturelle Differenzierung ist bei den Wildformen der hexaploiden *A. millefolium* kaum festzustellen. — Mit Ausnahme der Pflanze Krailbachtal fix. 5, wo die mäßige Aberrationsrate nur als Nebenprodukt der physiologischen Störungen zu werten ist, als deren Hauptwirkung Defekte der Zellwandbildung und die Entstehung zweikerniger PMZ auftreten, konnte in keinem einzigen Fall Fragmentation oder Brückenbildung beobachtet werden.

Bemerkenswert ist bei den Hexaploiden das relativ häufige Auftreten von Spindelstörungen. Das Erscheinungsbild zeigt — ähnlich wie bei den schon bearbeiteten stärkeren spontanen Chromosomenaberrationen der Diploiden (EHRENDORFER 1959b) — beträchtliche intra-individuelle Labilität. Selbst bei stark gestörten Individuen ist die Mehrzahl der PMZ normal, gestörte PMZ liegen neben ungestörten im gleichen Antherenfach. So sind z. B. bei der Pflanze Lappland-Abisko, SUI 3766-2 etwa 65% der Tetraden normal, 15% zeigen schwache, 20% starke Restitutionskernbildung als Folge von Spindeldefekten (120 PMZ). Degeneration ganzer Antherenfächer, vielfach noch vor Einsetzen der Hauptphase der Meiose, ist seltener. Nur bei einer noch nicht näher untersuchten Pflanze vom Wiener Schneeberg (Sparbacher Hütte 21-2) ist unter den Kulturbedingungen im HBV totale Pollensterilität gegeben.

Bei den spindelgestörten Pflanzen ist meist eine verstärkte Desynchronisierung im Meioseablauf zwischen den PMZ in einzelnen Antherenfächer festzustellen. Die Störungen im Spindelmechanismus nehmen gegen Meta und Ana II in steigendem Maß an Intensität zu. Da die Spindelstörungen bei *A. millefolium*, *A. distans* und *A. pannonica* prinzipiell gleichartig sind, sei schon im folgenden auf die entsprechenden Belegabbildungen dieser Kleinarten hingewiesen. — Im wesentlichen lassen sich 2 verschiedene Störungsformen des Spindelmechanismus erkennen: 1) *Reduzierte Spindelaktivität:* Mangelhafter Transport der geteilten Elemente an die Pole, mangelhafte Zugwirkung auf die noch in der Region der Äquatorialplatte liegenden Univalente (Abb. 2h und 4c); als Folge treten nachhinkende Elemente auf, die vielfach der Elimination verfallen (Abb. 2d). In extremeren Fällen kommt es infolge mangelhafter Trennung der Chromosomenmassen in Ana II, seltener schon in Ana I zur Bildung von hantelförmigen oder ± abgerundeten Restitutionskernen (Abb. 2f: zusammenfließende Meta II-Platten aus einem hantelförmigen Restitutionskern der Telo I; Abb. 4d: Restitutionskern aus Telo II). — 2) *Mehrpolige Spindel:* Ausbildung von drei,

seltener auch mehr Spindelpolen, fast ausschließlich erst in Ana II (Abb. 2g); als Folge treten in Telo II bis zu 6 und mehr Tochterkerne auf (Abb. 2i); infolge von Spindelschwächung und mangelhafter Trennung der Chromosomenmassen entstehen aber meist wenige, unregelmäßige Restitutionskerne. — Störungsform 2) ist bei den untersuchten polyploiden Achilleen wesentlich seltener und meist zusammen mit 1) in gestörten PMZ aufzufinden.

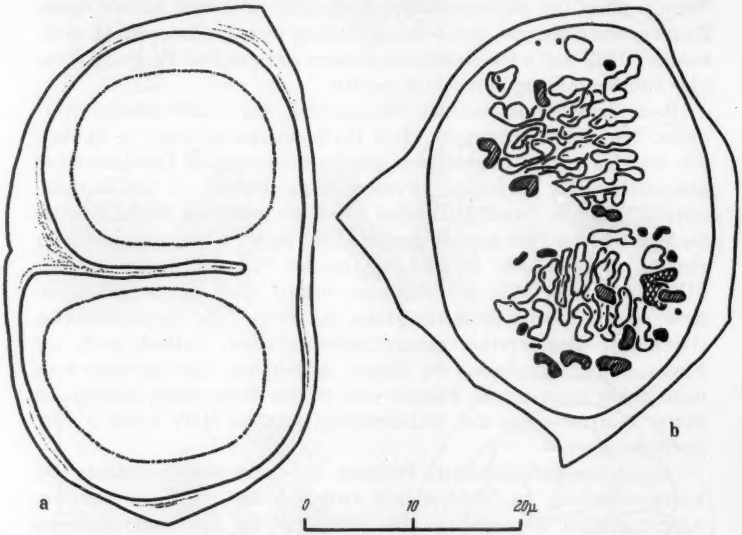


Abb. 3a u. b. Hexaploide Sippe. *A. millefolium* s. str. (Krailbachtal, fix. 5). Zweikernige PMZ und zugeordnete Störungen der Meiose. a Zwei fast vollständig durchgetrennte PMZ in Prophase. b Zwei vollständig verschmolzene PMZ mit Univalenten, einem Trivalent, Chromosomen- (bzw. Isochromatid-) Fragmenten und Reunionsfolgen (etwa bei einem Element in der Mitte) (unvollständig durchgezeichnet)

Die oben geschilderten Spindelstörungen wurden mit abnehmender Intensität bei den *A. millefolium*-Wildformen Lappland-Abisko: SUI 3756-2, Appennin-Abetone: fix. 12 und Niederösterreich-Unterkirchbach: fix. 8, festgestellt. Nachbarpflanzen aus der Abetone-Population waren normal. Diese Tatsache, noch mehr aber das Auftreten starker Spindelstörungen in Hybrid-Nachkommen der Pflanzen Abisko SUI 3766-2 und besonders die Aufspaltung des Merkmalsgegensatzes „Normal/schwache bis starke Spindelstörungen" in der F_2-Nachkommenschaft SUI 5810 (EHRENDORFER 1952a, 1959f) zeigen mit Sicherheit an, daß hier idiotypische und zwar vorzüglich genische (bzw. kryptostrukturelle) Steuerung vorliegen muß. — Da die Spindelstörungen weder mit der

Syndesefrequenz noch mit Defekten der Zellwandbildung, chromosomenstruktureller Differenzierung oder anderen Abnormitäten gekoppelt sind, muß hier von primären Defekten des Spindelmechanismus gesprochen werden.

Besonders auffällig ist eine Pflanze aus der Population Krailbachtal (fix. 5, $n = 27$) mit Defekten der Zellwandbildung nach der letzten prämeiotischen Mitose, als deren Folge zweikernige PMZ entstehen. Auch hier liegen ungestörte neben gestörten PMZ im gleichen Antherenfach. In der Ausbildung der Trennungswand zwischen 2 zusammenhängenden Schwester-PMZ gibt es alle Übergänge von fast vollständiger Trennung (Abb. 3a: Prophase) bis zu vollständiger Verschmelzung (Abb. 3b: Meta I); vollständige Verschmelzung ist bei weitem am seltesten. Unter 110 PMZ waren bei der vorliegenden Pflanze 88 normale Einzelzellen und 22 ± stark fusionierte Doppelzellen. Desynchronisierung des Meioseablaufes zwischen den beiden Fusionszellen ist kaum gegeben. Als Folge der abnorm veränderten physiologischen Verhältnisse tritt ganz vereinzelt spontane Chromosomen-(bzw. Isochromatid-)Fragmentation und mäßige Reunion freier Bruchenden auf (Abb. 3b). Solche mäßige spontane Aberrationen wurden bei Krailbachtal fix. 5 unter mehr als 200 PMZ *nur* bei einer extremen Fusionszelle gefunden; bei 2 weiteren PMZ wurden einzelne Ana I-Brücken mit zugehörigen Fragmenten festgestellt. Damit sind hier wohl grundsätzlich andere Verhältnisse gegeben als bei vielen diploiden Achillen, bei denen Chromosomen-Aberrationen als Primärdefekte auftreten (Ehrendorfer 1959b).

Die Größe der Chromosomen bei der hexaploiden *A. millefolium* s. str. ist gegenüber den Tetraploiden, besonders gegenüber *A. collina*, nur mäßig reduziert.

b) *Achillea borealis*. Außer mäßigen Störungen der Syndese mit Multi- und Univalenten bzw. ungepaarten Homologen wurden in Pollenmeiosen von 21 Individuen dieser nordamerikanischen Cyto-Species aus Kalifornien, Oregon und Washington keine Defekte der Chromosomenreproduktion und des Spindelapparates festgestellt. — Bemerkenswert ist eine aneuploide Pflanze aus Washington: Pacific Co., Sea View, SUI Cl. 2354 mit $2n = 53$, deren Entstehung wohl mit Sicherheit auf die bei den Polyploiden so häufige irreguläre Chromosomenverteilung in Ana I und II (vgl. S. 468—469) zurückgeführt werden darf.

c) *Achillea distans*. Bei dieser stark hybridogenen Populationsgruppe sind Defekte der Pollenmeiose anscheinend etwas häufiger als bei den beiden vorhergehenden Sippen. Von 6 genauer analysierten Individuen vom Alpenostrand, den Südalpen und dem nördlichen Appennin wurden bei 4 in unterschiedlicher Frequenz Multi- und Univalente und als Folge irreguläre Chromosomenzahlen bei zusammengehörenden Meta II-Gruppen (Abb. 2e) und Mikro-Nuclei in den Tetraden fest-

gestellt. Bei einer Pflanze vom Alpenostrand (Teufelsstein SUI 6369) treten Anaphase-Brücken auf, bei der südalpinen Altissimo, fix. 20, kommen in Meta I vereinzelte Chromosomenfragmente vor. Bei letzterer Pflanze finden sich auch Spindelstörungen, mangelhafte Einordnung von Bivalenten und Bivalenthälften in die Äquatorialplatte während Meta I und II, mehrpolige Spindeln in Ana II (Abb. 2g), Restitutionskernbildung u. a.

3. Oktoploide Sippen

a) ***Achillea pannonica.*** Für die Untersuchung der Pollenmeiose dieser Hochpolyploiden standen 7 Individuen zur Verfügung, 4 Wildformen und 3 Inzuchtpflanzen aus der ersten Inzuchtgeneration verschiedener Linien. Ähnlich wie bei der tetraploiden *A. collina* (S. 465), weisen auch hier die Inzuchtpflanzen eine verstärkte Störungslabilität auf. Nur bei einer der 4 Wildformen, aber bei allen 3 Inzuchtpflanzen ist eine erhöhte Multi- und Univalentfrequenz feststellbar. Neben Quadrikommen auch Trivalente vor (Abb. 4b), höhere Verbände wurden bisher nicht festgestellt; z. T. finden sich auch ungepaarte Homologe (Abb. 4a). Die Univalente werden bei der Inzuchtpflanze 123-1 relativ häufig in Ana II noch ein zweites Mal geteilt, wobei es öfters zu Zerrungen am Centromer kommt (Abb. 4c). Von 500 Meta I-Elementen sind bei der Inzuchtpflanze 128-1 4 IV, 1 III+I, 4 I+I (ungepaarte Homologe, der Rest II (davon 26,3% ring- und 73,7% stabförmige). Mehrfach wurde irreguläre Verteilung der Multi- und Univalente auf Ana I- und II-Gruppen festgestellt. Bei den stärker gestörten Pflanzen finden sich in bis zu 30% der Tetraden Mikro-Nuclei.

Bei den beiden Inzuchtpflanzen 123-1 und 128-1 zeigt auch der Spindelapparat Defekte nach Störungstyp 1 (vgl. S. 469): Die Elemente werden in Ana I, besonders aber in Ana II nur unvollständig und verspätet gegen die Pole transportiert, wodurch sich Verschmelzungen der Ana II-Gruppe ergeben (Abb. 4c) und Restitutionskerne entstehen; bei 128-1 finden sich solche Restitutionskerne in 3,3%, bei 123-1 in 18,7% der Tetraden (200 PMZ) (Abb. 4d).

Chromosomenstrukturelle Differenzierung tritt bei *A. pannonica* sehr stark zurück. Nur bei 123-1 und 128-1 wurden ganz vereinzelte Ana I- und II-Brücken beobachtet.

Die Größe der Chromosomen ist bei der oktoploiden *A. pannonica* gegenüber der hexaploiden *A. millefolium* s. str. teils unverändert, teils sogar vermehrt und dann etwa derjenigen der Tetraploiden entsprechend.

b) ***Achillea monticola.*** Von dieser Oktoploiden, die vorläufig nur aus dem Raum der Pyrenäen bekannt ist und noch weiteren Studiums bedarf, sind bisher 4 Individuen im Hinblick auf den Ablauf der Pollenmeiose untersucht worden. Davon zeigt eine Pflanze (Puerta bon Agua,

fix. 14) als Folge exzessiver Multi- und Univalentbildung sowie Nachhinken der Elemente in Ana I und II in etwa 40% der Tetraden Mikro-Nuclei.

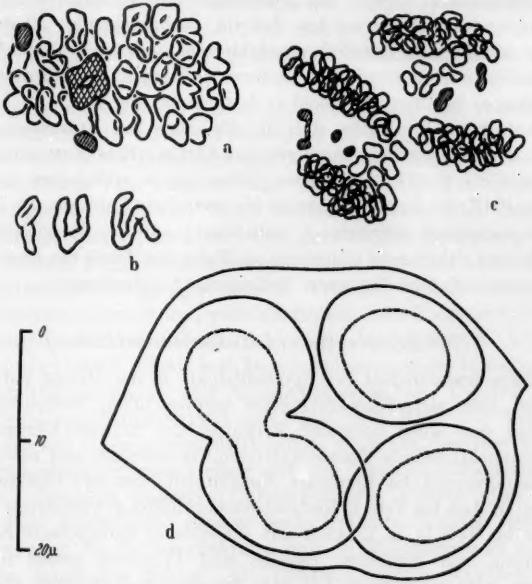


Abb. 4a—d. Oktoploide Sippe. *A. pannonica* (123-1). Störungen der Pollenmeiose. a Meta I mit 33 II + IV + 2 I. b Multivalente (III, IV). c Ana bis Telo II, verspätete Teilung von Univalenthälften (links) und mangelhafte Spindelaktivität mit Ansätzen zur Restitutionskernbildung (rechts). d Vollzogene Restitutionskernbildung aus Telo II im Tetradenstadium

D. Allgemeiner Teil und Diskussion

1. Störungen der Chromosomenreproduktion

Im Vergleich mit den diploiden treten bei den polyploiden *Achillea*-Sippen Defekte der Chromosomenreproduktion, wie etwa spontane Chromosomenbrüche und überhaupt Anzeichen für strukturelle Chromosomenumbauten stark zurück. Von 139 untersuchten Individuen fanden sich nur bei 4 vereinzelte freie Chromosomen- (bzw. Isochromatid-) Fragmente, wobei das Störungsausmaß eben noch Stufe (2) (vgl. EHRENDORFER 1959b, S. 373, 376) erreichte; daneben wurden bei diesen 4 und 11 anderen Individuen vereinzelte Ana I- und II-Brücken, größtenteils mit zugehörigen Fragmenten festgestellt. Ohne Prophase-Analysen ist bei der geringen Frequenz dieser Brücken nicht mit Sicherheit zu ent-

scheiden, ob es sich dabei um Folgen von unmittelbar vorhergegangenen Bruch-Reunionen oder um Folgen von Strukturheterozygotie handelt; die erste Alternative dürfte allerdings in der Mehrzahl der Fälle größere Wahrscheinlichkeit haben. Im großen und ganzen kann demnach ein fortschreitendes Seltenerwerden der im vorhergehenden Beitrag für diploide Achilleen ausführlich geschilderten spontanen Chromosomenaberrationen und zugeordneten anderen Störungen der Chromosomenreproduktion bei den Polyploiden festgestellt werden[1]. Es bestehen keine Anhaltspunkte dafür, daß die Ursachen des Störungssyndroms sich mit der Polyploidisierung verändert hätten. Eine Ausnahme davon macht nur die S. 471 besprochene Form von *A. millefolium* mit zweikernigen PMZ; bei dieser Pflanze ist die vermehrte Labilität der Chromosomenreproduktion nämlich ± vollständig auf die Doppelzellen beschränkt und daher wohl sicher nur als Folge der durch die Fusion stark veränderten zellphysiologischen Bedingungen aufzufassen.

2. Spindelstörungen und Restitutionskernbildung

Das Erscheinungsbild der Spindeldefekte in der Meiose polyploider Achilleen läßt sich folgendermaßen kennzeichnen: reduzierte, aber gegenüber dem sonst normalen Verhalten der Bivalent-Chromosomen nicht desynchronisierte Spindelaktivität, Nachhinken und mangelhafte Spindeleinordnung der Elemente, Zusammenfließen der Chromosomengruppen in Ana bis Telo I, Restitutionskernbildung, verstärkte Defekte in Meta bis Telo II, z. T. auch mit Ausbildung multipolarer Spindeln, Entstehung von Monaden, Dyaden und Polyaden neben normalen Tetraden, intra-individuelle Labilität der Störungsintensität, aber selbst bei stark gestörten Pflanzen noch reichlich funktionsfähiger Pollen (vgl. S. 469). Dieses Störungsbild entspricht in wesentlichen Zügen vielen anderen bekannten Fällen von Spindeldefekten, ganz gleich, ob sie nun durch modifikative Eingriffe (vgl. etwa HAGA und KAYANO 1955, BRACHET 1957, SWANSON 1957, M. S. WALTERS 1958) oder durch diverse autonome Mechanismen im Idiotypus (vgl. S. 475) ausgelöst wurden. Der Zusammenbruch des Spindelmechanismus folgt also — ebenso wie der Zusammenbruch der Chromosomenreproduktion — einem ± einheitlichen Geleise.

Bemerkenswert ist, daß auch die Spindeldefekte — ähnlich wie die Chromosomenaberrationen — im offensichtlich besonders stoffwechsellabilen und damit störungsanfälligen generativen Bereich gehäuft in Erscheinung treten: in den prämeiotischen Mitosen, besonders in der Meiose, im Endosperm und im Tapetum, wo Spindeldefekte vielfach zum

[1] Die Gründe für diese Verschiebung sollen im folgenden Beitrag (EHRENDORFER 1959d) besprochen werden.

normalen Differenzierungsprozeß gehören. Seltener greifen intensive Spindelstörungen auch auf den somatischen Bereich über; hierher gehören etwa die durch abnormes Spindelverhalten bedingten Fälle von intra-individueller Aneuploidie, die sich besonders bei Polyploiden finden (EHRENDORFER 1959b, S. 397). Bei polyploiden Achilleen liegen vorläufig noch keine Hinweise für derartige Schwankungen der somatischen Chromosomenzahlen vor.

Der normale Ablauf der Chromosomenbewegung und Verteilung in Mitose und Meiose der höheren Pflanzen beruht im allgemeinen auf einem Zusammenwirken von Polkappen und Centromeren und damit auf einem Zusammenwirken von Plasmon- und Genom-Elementen, wobei viele Einzelprozesse in komplexer Weise ineinandergreifen (vgl. dazu etwa M. S. WALTERS 1958, DIETZ 1958 und dort zitierte Literatur). Dieses Balance-System kann durch Störungsfaktoren mittelbar und unmittelbar in Mitleidenschaft gezogen werden. Von den spontan auftretenden Spindeldefekten erweisen sich viele als Begleit- oder Folgeerscheinungen von Chromosomenaberrationen (wie z. B. bei diploiden Achilleen, EHRENDORFER 1959b, S. 396), bzw. Desynchronisierung der Meioseprozesse (bezüglich Chromosomen- und Spindelkomponente: UPCOTT 1937b, DARLINGTON und THOMAS 1937 usw., bezüglich PMZ und Tapetum: GENTCHEFF und GUSTAFSSON 1940b usw.). Noch häufiger aber scheinen die Störungsfaktoren unmittelbar auf den Spindelmechanismus einzuwirken. Derartige rezessive Defekt-Faktoren wurden etwa für diploiden Mais beschrieben: divergierende Spindeln (CLARK 1940) und komplexe, auch die Zellwandbildung stark in Mitleidenschaft ziehende Störungen durch den Faktor „va" (BEADLE 1932a). Vielfach treten solche Störungsfaktoren des Spindelapparates aber erst dann in Erscheinung, wenn die Normalamplitude des Balance-Systems Plasmon-Genom durch Hybridisierung, Aneuploidie und besonders durch Polyploidie eingeengt wird. Oft wirken diese „Verstärker" zusammen, wie etwa bei trisomen *Lolium-Festuca*-Hybriden (DARLINGTON und THOMAS 1937), bei polyploiden Hybriden der *Gramineae-Hordeae* (GAUL 1954b, POHLENT 1958) und *Bromus* (M. S. WALTERS 1958), bei den Amphiploiden *Primula kewensis* (UPCOTT 1939c) sowie *Laya pentaglossa* (CLAUSEN, KECK und HIESEY 1945), bei apomiktischen Formenkreisen, etwa *Leontoden* und *Picris* (BERGMANN 1935), *Calamagrostis* (NYGREN 1946) u. a. (vgl. GUSTAFSSON 1946—1947), ferner bei vielen Polyploiden, bei denen intra-individuelle Aneuploidie durch Spindeldefekte bedingt ist (Hinweise bei EHRENDORFER 1959b, S. 397).

Ähnliche Verhältnisse liegen offensichtlich auch bei den spindeldefekten polyploiden Achilleen vor. Durch Kreuzung ist hier auch experimentell eine Verstärkung der Spindelstörungen möglich (EHRENDORFER 1952a, 1959f; SCHNEIDER 1958), wobei hervorzuheben ist, daß

bei diploiden Hybriden derartige Defekte bisher nicht beobachtet wurden. Die idiotypisch, wesentlich genisch (bzw. kryptostrukturell) bedingte Natur der Spindelstörungen bei polyploiden Achilleen geht ferner aus der Aufspaltung in F_2 hervor (S. 470, EHRENDORFER 1952a, 1959f); weitere Anhaltspunkte ergeben sich aus der Möglichkeit einer Anreicherung der Spindeldefekte durch Inzucht (vgl. dazu die Hinweise auf *A. pannonica*, 123-1 und 128-1, S. 472). Ganz entsprechende Ergebnisse haben genetische Analysen von spindelgestörten Formen hexaploider Weizen (SAPĚHIN 1930), *Mentha* (SWANSON und NELSON 1942) und Inzuchtgenerationen von *Laya pentaglossa* (CLAUSEN, KECK und HIESEY 1945) geliefert. Als Beispiele für die Zunahme von primären, also nicht mit Aberrationen, Desynchronisierung und Univalenten im Zusammenhang stehenden Spindeldefekten mit steigender Polyploidie seien folgende Diploid-Polyploid-Reihen genannt: *Allium* (LEVAN 1935b), *Galium* (FAGERLIND 1937), *Solanum* (LAMM 1945), *Phleum* (LEVAN 1949a) und *Triticale* (MÜNTZING 1957); weiters finden sich spindeldefekte Polyploide etwa bei den Gattungen *Psilotum*, *Lathraea*, *Hemerocallis*, *Gladiolus*, *Musa* (Literaturhinweise bei TISCHLER 1942 bis 1951, S. 551, 572—575, 619—621), *Sorghum* (JANAKI-AMMAL 1941a) und *Nitraria* (REESE 1958). Die Zunahme von Spindeldefekten mit steigender Polyploidie wird weiter belegt durch die relativ viel größere Häufigkeit von Restitutionskernbildung bei Polyploiden und vor allem auch durch die große Zahl von Polyploiden mit intra-individueller Aneuploidie (vgl. die Angaben bei EHRENDORFER 1959b, S. 397).

3. Störungen der Zellwandbildung

Die spärlichen Befunde über mangelhafte Zellwandbildung bei polyploiden Achilleen beziehen sich auf 2 Entwicklungsphasen in der generativen Sphäre, aus denen derartige Abnormitäten schon mehrfach beschrieben wurden: defekte Wandbildung zwischen den sich teilenden Archaesporzellen und defekte Wandbildung zwischen den Tetradenzellen in den Antheren. Im ersten Fall entstehen Paare von $\pm$ vollständig miteinander fusionierten PMZ, im zweiten Fall ist die normalerweise simultane teilweise in sukzedane Wandbildung übergegangen. Obwohl die Spindel vielfach an der Bildung des Phragmoplasten mitbeteiligt ist und sich daher öfters korrelierte Störungserscheinungen ergeben, wurden in den beiden vorliegenden Fällen keine Unregelmäßigkeiten der anaphasischen Chromosomenverteilung festgestellt.

Zweikernige PMZ wurden mehrfach, so zuletzt bei triploiden *Avena*-Pflanzen (HOLDEN und MOTA 1956), haploidem *Antirrhinum* (RIEGER 1958) und besonders bei Polyploiden und Hybriden von *Gossypium* (SARVELLA 1958) beobachtet. Ebenso wie bei ganz vereinzelten, extrem verschmolzenen PMZ-Paaren von *Achillea*, wurden auch bei *Avena* und

Antirrhinum als Folge stark veränderter zellphysiologischer Bedingungen spontane Chromosomenaberrationen beobachtet. Echte Cytomixis mit partiellem Übertritt von Chromatinmaterial oder gar mit Kernfusionen wurden im vorliegenden Material nicht gefunden. Derartige Verhältnisse finden sich im extremen Ausmaß etwa bei einer rezessiven Mutante von *Hordeum* (L. SMITH 1942), bei polyploiden *Galium*-Formen (FAGERLIND 1937), polyploiden Gattungsbastarden der *Gramineae-Hordeae* (GAUL 1954b), hochpolyploiden *Sorghum*-Typen (PRICE 1956) und bei Apomikten (vgl. z. B. NYGREN 1946). — Angaben über abnorme, biotypenspezifische Verschiebung von simultaner zu sukzedaner Wandbildung in den Tetraden finden sich u. a. für polyploide Formen von *Galium* (FAGERLIND 1937); extreme Ausmaße erreichen die Störungen der Zellwandbildung in den Tetraden bestimmter Birnensorten (DOWRICK 1958). — In ähnlicher Weise wie bei den Spindelstörungen scheint auch bei den diversen Typen defekter Zellwandbildung mangelhafte Genom-Plasmon-Balance vielfach als „Verstärker" für sonst kaum in Erscheinung tretende Störungsfaktoren wirksam zu werden.

4. Störungen der meiotischen Chromosomenpaarung

Obwohl die im speziellen Teil beschriebenen Untersuchungen an polyploiden Achilleen nicht speziell auf die Klärung der meiotischen Paarungsverhältnisse ausgerichtet waren, lassen sich doch auch in dieser Hinsicht einige Schlußfolgerungen ziehen. — Bemerkenswert ist vor vor allem das sehr starke Zurücktreten von Multivalenten bei allen untersuchten polyploiden Wildformen des *A. millefolium*-Komplexes (139 Individuen): bei mehr als der Hälfte fehlen Multivalente oder treten nur vereinzelt auf; selbst bei den Oktoploiden wurden umfangreichere Chromosomenverbände als Quadrivalente nicht beobachtet. Diese Verhältnisse kontrastieren zu der hohen Trivalent-Frequenz einer autotriploiden *A. crithmifolia* (EHRENDORFER 1959b, S. 382) und stehen scheinbar im Widerspruch mit der cytogenetisch erhärteten Tatsache, daß die verschiedenen Genome der polyploiden Sippen des *A. millefolium*-Komplexes untereinander weitestgehend homolog sind (EHRENDORFER 1959e). — Weitere Beobachtungen belegen die positive bzw. negative Korrelation zwischen Chiasma-Frequenz und Multi- bzw. Univalent-Frequenz. Bei den Multivalenten ergibt sich meist eine recht deutliche zahlenmäßige Überlegenheit der (in den Anaphasen meist regelmäßig verteilten) Quadri- gegenüber den Trivalenten (mit zugehörigen Univalenten).

Individuen mit relativ hoher Multivalent-Frequenz (bis etwa 0,5 je PMZ), solche mit ± ausschließlicher Bivalentbildung und schließlich solche mit vereinzelten ungepaarten Homologen (bis etwa 0,2 je PMZ) konnten vielfach nebeneinander unter gleichartigen Bedingungen am

natürlichen Standort bzw. auf den Kulturflächen SUI bzw. HBV festgestellt werden, wobei durch blockweise Fixierungen modifikative Umwelteinflüsse weitgehend ausgeschaltet wurden. Ähnlich wie für die Diploiden muß daher auch für die Polyploiden auf eine gewisse idiotypische Steuerung der Chiasma-Frequenz und der Multi-, Bi- bzw. Univalentrate geschlossen werden. Die entsprechenden Steuerfaktoren sind offensichtlich in den Populationen der Polyploiden in der Weise im Equilibrium, daß bei der überwiegenden Mehrzahl der Individuen trotz der strukturellen Übereinstimmung der Genome in der Pollenmeiose fast ausschließlich Bivalente gebildet werden. Innerhalb der Einzelindividuen wird das Zusammenspiel der syndese-steuernden Faktoren offensichtlich durch Inzucht[1] gestört; darauf deutet die mehrfach festgestellte Zunahme der Streuungsbreite im Syndese-Ablauf (Multi- und Univalentbildung, Entstehung von Mikro-Nuclei) bei erzwungenen Selbstungsnachkommen. — Eine Besprechung der Syndeseverhältnisse bei diploiden und polyploiden Achilleen unter Berücksichtigung der diesbezüglichen Literatur soll in der folgenden Arbeit und im Zusammenhang mit der ausführlichen Darstellung der experimentellen Kreuzungsergebnisse erfolgen (EHRENDORFFER 1959d und f).

Als Folge unregelmäßiger Verteilung von Multivalenten und im Zuge der Eliminierung von Univalenten bzw. Univalenthälften durch Bildung von Mikro-Nuclei entsteht ein gewisser Prozentsatz von Gameten mit aneuploiden Chromosomenzahlen. Es ist bemerkenswert, daß aus solchen Gameten unter natürlichen Bedingungen nur äußerst selten konkurrenzfähige Individuen entstehen (S. 471).

5. Zusammenhänge zwischen den Einzelkomponenten des Störungsbildes

Bei der Analyse der Pollenmeiose von polyploiden Achilleen sind bisher 5, nur geringfügig miteinander in Beziehung stehende Störungen bzw. Störungssyndrome festgestellt worden. I. Störungen der Syndese: mangelhafte Balance zwischen Chiasma-Frequenz und Partnerwechsel-Chiasma-Interferenz[2] — vereinzelte Multivalente und Univalente bzw. ungepaarte Homologe — Mikro-Nuclei, unregelmäßige Chromosomenverteilung auf die Gameten — aneuploide Nachkommenschaft. II. Störungen der Chromosomenreproduktion: mäßige Aberrationen. III. Primäre Spindelstörungen: mangelhafte Spindelaktivität, Bildung mehrpoliger Spindeln in Meta bis Telo I, besonders aber II — unregelmäßige Chromosomenverteilung — Restitutionskernbildung. IV. Mangelhafte

[1] Die bisher untersuchten Formen des *A. millefolium*-Komplexes sind unter natürlichen Bedingungen weitgehend allogam (EHRENDORFER 1959f).

[2] Diese teilweise hypothetische Deutung der Multivalent-Reduktion muß wegen Abb. 5 schon hier vorweggenommen werden; eine ausführliche Begründung findet sich in den folgenden Beiträgen (EHRENDORFER 1959d und f).

oder unterbleibende Zellwandbildung nach der letzten prämeiotischen Mitose — zweikernige PMZ mit veränderten zellphysiologischen Bedingungen — vereinzelte Chromosomenaberrationen. V. Zellwandbildung in den Tetraden von simultan zu sukzedan verschoben.

Störungssyndrom I ist auf Polyploide mit untereinander ± homologen Genomen beschränkt, II erfährt mit steigender Polyploidie eine fortschreitende Abpufferung, während III, vielleicht auch IV und V, sich umgekehrt verhalten und offensichtlich erst durch die mit steigenden

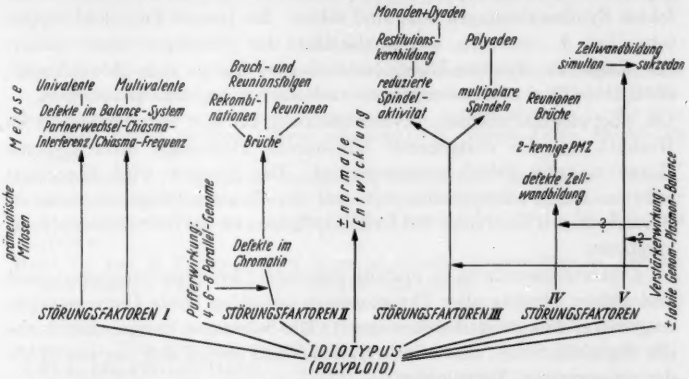


Abb. 5. Versuch einer schematischen Darstellung der Zusammenhänge zwischen den Einzelkomponenten im Störungsbild der Pollenmeiose bei polyploiden Achilleen: Störungssyndrom *I* Syndesestörungen; *II* Störungen der Chromosomenreproduktion; *III* primäre Spindeldefekte; *IV* und *V* Defekte der Zellwandbildung. Weitere Erklärungen im Text

Ploidiestufen immer labilere Genom-Plasmon-Balance verstärkt und damit in Erscheinung gebracht werden. In Abb. 5 wurde versucht, die z. T. hypothetischen Vorstellungen über die Zusammenhänge zwischen den Störungsfaktoren und ihre Auswirkung als Einzelstörungen bzw. Störungssyndrome graphisch zur Darstellung zu bringen.

Zusammenfassung

1. Ausmaß, Verbreitung und Wesen der spontanen Störungen der Pollenmeiose bei polyploiden Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes wurden an Hand cytologischer Analysen von 139 Wildformen untersucht (jeweils mindestens 50—100 PMZ). Die Daten beziehen sich auf die tetraploiden *A. roseo-alba* (Introgressionspopulationen), *A. collina* und *A. lanulosa*, auf die hexaploiden *A. millefolium* s. str., *A. borealis* und die ± hybridogene *A. distans*, ferner auf die oktoploiden *A. pannonica* und *A. monticola*.

2. Auf Grund der Korrelation bzw. Unabhängigkeit der Einzelkomponenten des Störungsbildes muß auf das Vorliegen von 5 ver-

schiedenen, voneinander ± unabhängigen Störungssyndromen geschlossen werden: I. Störungen der Syndese, II. Störungen der Chromosomenreproduktion, III. Primäre Spindelstörungen, IV. und V. Störungen der Zellwandbildung.

3. Störungssyndrom I tritt bei etwa 40% der untersuchten Polyploiden auf und umfaßt vor allem Individuen mit vereinzelten Multivalenten (bis etwa 0,5/MPZ), seltener auch solche mit vereinzelten ungepaarten Homologen (bis etwa 0,2/PMZ). Bei etwa 60% der Individuen fehlen Syndesestörungen oder sind selten. Bei jungen Polyploid-Sippen (etwa bei *A. roseo-alba*, 4x) ist die Rate der Störungen relativ höher. Als Folge der Syndese-Unregelmäßigkeiten finden sich Mikro-Nuclei, aneuploide Gameten und sehr vereinzelt auch aneuploide Wildformen. — Die überwiegend normale Bivalentpaarung bei den Polyploiden ist im Hinblick auf die weitgehende strukturelle Homologie ihrer Genome (EHRENDORFER 1959f) bemerkenswert. Die Syndese wird zumindest teilweise durch idiotypische, u. a. auf die Chiasma-Frequenz wirkende Steuerfaktoren bestimmt. Bei Inzuchtpflanzen ist die Störungsamplitude verstärkt.

4. Störungssyndrom II umfaßt spontane Chromosomenaberrationen und Folgen struktureller Chromosomenumbauten (freie Chromosomenfragmente, Anaphase-Brücken usw.). Die Störungen entsprechen denen der diploiden Stufe, sind aber schwächer und finden sich nur bei 10,1% der untersuchten Polyploiden.

5. Störungssyndrom III umfaßt primäre Defekte des Spindelmechanismus: reduzierten Transport der Elemente an die Pole, Ausbildung multipolarer Spindeln, Zusammenfließen von Anaphasegruppen und Restitutionskernbildung mit Höhepunkt in Ana bis Telo II und als Folge Ausbildung von Monaden, Dyaden und Polyaden; es liegt keine Korrelation mit Chromosomenaberrationen, exzessivem Anfall von Univalenten oder Desynchronisierung vor. Der Störungsablauf ist labil, selbst bei stark gestörten Individuen ist noch die Mehrzahl der Tetraden normal. Spindeldefekte wurden bei 4,3% der untersuchten polyploiden Wildformen (und bei experimentellen Hybriden) festgestellt. Störungssyndrom III wird weitgehend von idiotypischen Steuerfaktoren bestimmt; diese Faktoren können durch Inzucht angereichert werden und erfahren durch Polyploidie und Hybridisierung — offensichtlich infolge vermehrter Labilität der Genom-Plasmon-Balance — eine Verstärkung.

6. Die Störungssyndrome IV und V umfassen Defekte der Zellwandbildung und sind bisher nur bei Einzelindividuen festgestellt worden. Bei IV handelt es sich um ± vollständiges Ausbleiben der Zellwandbildung nach der letzten prämeiotischen Mitose, Entstehung von ± miteinander fusionierten Paaren von PMZ (ohne Kernverschmelzungen)

und damit korrelierten, allerdings sehr vereinzelten Chromosomenaberrationen; bei V liegt sukzedane statt simultaner Zellwandbildung in den Tetraden vor. Auch für die Störungen IV und V ist idiotypische Steuerung wahrscheinlich.

7. Die Chromosomengröße nimmt mit steigender Ploidiestufe im allgemeinen ab, doch ergeben sich gewisse Überschneidungen und Ausnahmen. Besonders hinzuweisen ist auf biotypenspezifische Verschiedenheit der Chromosomengröße auf ein- und derselben Ploidiestufe.

Literatur[1]

Dietz, R.: Multiple Geschlechtschromosomen bei den cypriden Ostracoden, ihre Evolution und ihr Teilungsverhalten. Chromosoma (Berl.) **9**, 359—440 (1958).

Dowrick, G. G.: Abnormal parthenogenesis and embryo abortion in the pear variety Beurré Bedford *(Pyrus communis)*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 80—93 (1958).

Ehrendorfer, F.: Spontane Chromosomenaberrationen und andere Meiosestörungen bei diploiden Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, II.). Chromosoma (Berl.) **10**, 365—406 (1959b).

Haga, T., and H. Kayano: New types of meiotic abnormalities in *Trillium kamtschaticum* Pall. Cytologia **20**, 218—224 (1955).

Price, S.: Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. I. Syncytes in certain clones of *Saccharum* and *Erianthus*. Cytologia **21**, 21—37 (1956).

Reese, G.: Cyto-systematische Notizen zur Gattung *Nitraria (Zygophyllaceae)*. Flora **146**, 478—488 (1958).

Sapéhin, L. A.: Über die faktorielle Natur der Unterschiede im Verlauf der Reduktionsteilung. Ber. dtsch. bot. Ges. **48**, 443—457 (1930).

Sarvella, P.: Cytomixis and the loss of chromosomes in meiotic and somatic cells of *Gossypium*. Cytologia **23**, 14—24 (1958).

Swanson, C. P., and R. Nelson: Spindle abnormalities in *Mentha*. Bot. Gaz. **104**, 273—280 (1942).

Walters, M. S.: Aberrant chromosome movement and spindle formation in meiosis of *Bromus* hybrids: an interpretation of spindle organization. Amer. J. Bot. **45**, 271—289 (1958).

[1] In den Literaturangaben sind nur die Arbeiten aufgenommen, die sich weder im vorhergegangenen Beitrag II (Ehrendorfer 1959b), noch in den Handbüchern von Tischler (1942—1951, 1953—1957) finden.

Univ.-Doz. Dr. F. Ehrendorfer
Botanisches Institut der Universität,
Wien III, Rennweg 14

Chromosoma (Berl.) 10, 482—496 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Wien

UNTERSCHIEDLICHE STÖRUNGSSYNDROME DER MEIOSE BEI DIPLOIDEN UND POLYPLOIDEN SIPPEN DES ACHILLEA MILLEFOLIUM-KOMPLEXES UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE MIKRO-EVOLUTION

(ZUR PHYLOGENIE DER GATTUNG ACHILLEA, IV.)

Von

FRIEDRICH EHRENDORFER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 4. März 1959)

A. Einleitung

In den Beiträgen II und III wurde versucht, das Störungsbild der Pollenmeiose bei diploiden (EHRENDORFER 1959b) und polyploiden (1959c) Wildsippen des *Achillea millefolium*-Komplexes darzustellen, vor allem im Hinblick auf die einzelnen Störungskomponenten und deren Zusammenschluß zu charakteristischen Störungssyndromen, die Dynamik und Amplitude der Störungsphase und die idiotypische Steuerung der Störungsprozesse. Der vorliegende Beitrag IV soll die Einzeldaten über die Verbreitung der diversen Störungssyndrome bei Diploiden und Polyploiden (186 analysierte Individuen) in übersichtlicher Form zusammenfassen und damit die Unterschiede im Störungsbild der Diploiden und Polyploiden klar gegenüberstellen. Daraus ergibt sich dann folgende allgemeine Fragestellung:

1. Was sind die Ursachen für die unterschiedliche Verteilung der Störungssyndrome bei Diploiden und Polyploiden?

2. Welche Beziehungen bestehen zwischen den Störungssyndromen und den Normalprozessen der cytogenetischen Differenzierung im Zuge der Mikro-Evolution bei Diploiden und Polyploiden?

Mit dem Versuch einer Beantwortung dieser Fragen in den allgemeinen Abschnitten des vorliegenden Beitrages IV kann die Behandlung der cytologischen Befunde an Wildsippen des *Achillea millefolium*-Komplexes abgeschlossen werden. In den weiterführenden Beiträgen V und VI (EHRENDORFFER 1959e und f) sollen dann vor allem die Resultate experimenteller Kreuzungsversuche dargestellt werden.

B. Die Verteilung der diversen Störungen der Pollenmeiose bei diploiden und polyploiden Wildsippen von *Achillea*

Die folgende Zusammenstellung stützt sich in ganz überwiegendem Maße auf Sippen des *A. millefolium*-Komplexes (171 Individuen); nur

bei den Diploiden sind mit *A. crithmifolia* (7 Individuen) und einigen anderen Arten (8 Individuen) auch nicht unmittelbar zum *A. millefolium*-Komplex gehörige, aber damit doch nah verwandte Sippen mitberücksichtigt worden. — Außer 7 Individuen aus ersten Inzuchtgenerationen beziehen sich die folgenden Angaben ausschließlich auf Wildformen (Wf.).

Störungssyndrom I umfaßt Defekte der meiotischen Chromosomenpaarung und wird in entscheidendem Ausmaß von idiotypischen Steuerfaktoren bestimmt. Bei 30—40% der Diploiden kommen in bis zu 10% der PMZ (= 0,1/PMZ) einzelne ungepaarte Homologe vor. Im Gegensatz zu einer autotriploiden *A. crithmifolia* mit sehr hoher Trivalentfrequenz (5,2/PMZ) sind bei den übrigen untersuchten Polyploiden einschließlich der Pentaploiden (Schneider 1958) Multivalente relativ selten, eine Frequenz von 0,5/PMZ wird kaum überschritten; daneben kommen aber auch Polyploide mit ± stark gesenkter Chiasma-Frequenz und ungepaarten Homologen (bis zu 0,2/PMZ!) vor. Die Zahl der Individuen mit nennenswerter Multivalent-Frequenz nimmt mit steigender Ploidiestufe im Durchschnitt zu: *A. collina* (4x): 30%; *A. millefolium* (6x): 35%; *A. pannonica* (8x): 50%; Individuen mit ungepaarten Homologen (aber ohne Multivalente) wurden bisher nur bis zur hexaploiden Stufe beobachtet: *A. collina* (4x): 10%; *A. millefolium* (6x): 10%. Bei jungen Polyploiden, etwa bei den tetraploiden *A. roseo-alba*-Formen und bei den Inzuchtpflanzen ist die Rate der Syndesestörungen gesteigert. — Folgen von unregelmäßiger Syndese sind nachhinkende und z. T. als Mikro-Nuclei eliminierte Univalente, aneuploide Gameten und vereinzelt aneuploide Nachkommenschaft. — In Tabelle 1 und 2 wurden die Störungen aus Syndrom I nicht aufgenommen, da die Unterlagen aus den ersten Untersuchungsjahren für eine statistische Auswertung z. T. unzureichend sind.

Die Verteilung der Störungssyndrome II, III, IV und V ist in den Tabellen 1 und 2 sowie der Abb. 1 zusammenfassend dargestellt. Die Angaben in Tabelle 1 beziehen sich auf die Gesamtzahl der untersuchten Individuen (n) und auf Zahlen gestörter Individuen. Als Abschluß jeder Ploidiestufe wurden diese Zahlen summiert (Kursivdruck). In den Fällen, wo mehrere Störungen gleichzeitig bei einem Individuum auftreten (vor allem bei Chromosomenaberrationen und intra-individueller Aneuploidie), erfolgte die Eintragung mehrmals parallel. — Tabelle 2 stützt sich auf die Summenzahlen der Diploiden (2x), Tetraploiden (4x) sowie Hexa- und Oktoploiden (6x + 8x). Hier beziehen sich die Angaben auf den jeweiligen prozentuellen Anteil an gestörten Individuen. Die Anorthoploiden wurden in Tabelle 2 weggelassen, um eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten. — In Abb. 1 ist ein Teil der Daten aus Tabelle 2 in graphischer Form dargestellt. Um den Anteil ungestörter Individuen ohne akzessorische Chromosomen

Tabelle 1. *Zahlen von Individuen mit bestimmten Störungssyndromen der Pollenmeiose bzw. mit akzessorischen Chromosomen bei diploiden (2x), triploiden (3x), tetraploiden(4x), pentaploiden (5x), hexa- und oktoploiden (6x + 8x) Sippen des Achillea millefolium-Komplexes (und einiger nahverwandter Arten)* (vgl. auch S. 483 und Tabelle 2)

		n	Störungssyndrom II: spontane Chromosomenaberrationen (1)	(2)	(3)	total	intra-individuelle Aneuploidie	akzessorische Chromosomen	Störungssyndrom III: primäre Spindeldefekte	Störungssyndrom IV und V: gestörte Zellwandbildung
2x:	*setacea*	4	1		1	2	1			
	asplenifolia	8	2			2	2	3		
	roseo-alba	16	2	2	1	5		3		
	crithmifolia	7	1	1		2	3	1		
	andere Arten	8		1		1				
		43	*6*	*4*	*2*	*12*	*6*	*7*		
3x:	*crithmifolia*	*1*		1		1	1			
4x:	*roseo-alba*	7	4	1		5	1			
	collina	23	3	1		4		1	1	
	lanulosa	51	1			1				1 (V)
		81	*8*	*2*		*10*	*1*	*1*	*1*	*1 (V)*
5x:	*coll.* × *mill.* (Wf.)	*3*	1			1		1		
6x:	*millefolium*	20							2	1 (IV)
	borealis	21								
	distans	6	1	1		2			1	
		47	*1*	*1*		*2*			*3*	*1 (IV)*
8x:	*pannonica*	7	2			2			2	
	monticola	4								
		11	*2*			*2*			*2*	
		186								

Tabelle 2. *Prozentuelle Verteilung von Individuen mit bestimmten Störungssyndromen der Pollenmeiose bzw. mit akzessorischen Chromosomen bei 2x, 4x, 6x + 8x-Sippen des Achillea millefolium-Komplexes* (vgl. S. 483 und Tabelle 1)

	n	Störungssyndrom II: spontane Chromosomenaberrationen (1) %	(2) %	(3) %	total %	intra-individuelle Aneuploidie %	akzessorische Chromosomen %	Störungssyndrom III: primäre Spindeldefekte %	Störungssyndrom IV und V: gestörte Zellwandbildung %
2x	43	14,0	9,3	4,6	27,9	14,0	16,3	—	—
4x	81	9,9	2,4	—	12,3	1,2	1,2	1,2	1,2
6x + 8x	58	5,2	1,7	—	6,9	—	—	8,6	1,7

vor Augen zu führen, wurde die allermeist mit Chromosomenaberrationen korrelierte intra-individuelle Aneuploidie weggelassen; im übrigen ergeben sich kaum Überschneidungen. Durch die Position der Signaturen im unteren bzw. oberen Teil der Würfeldiagramme soll das unterschiedliche Verhalten der Störungssyndrome III (sowie IV und V) im Vergleich zu II veranschaulicht werden.

Störungssyndrom II umfaßt Defekte der Chromosomenreproduktion und ihre Folgen und unterliegt ebenfalls weitgehend idiotypischer Steuerung. Entsprechend der Gliederung im Beitrag II (EHRENDORFER 1959b, S. 376) wurde eine quantitative Erfassung des Störungsausmaßes durch Unterscheidung von 3, jeweils auf relativ am stärksten gestörte PMZ bezogene Kategorien versucht: 1. Schwache Störungen: meist nur Ana-Brücken. 2. Mäßige Störungen: neben Ana-Brücken und Translokations-Multivalenten freie Chromosomen-Fragmente. 3. Starke Störungen: Doppel-Brücken, starke Fragmentation bis Kern-„Zerstäubung" usw. Zugeordnete Defekte im Formwechsel der Chromosomen sowie Spindelstörungen und Restitutionskernbildung in PMZ mit ± vollständigem Zusammenbruch der Meiose infolge Fragmentation wurden in Tabelle 1 und 2 nicht berücksichtigt; derartige Defekte sind auf stärker gestörte Individuen der Diploiden beschränkt.

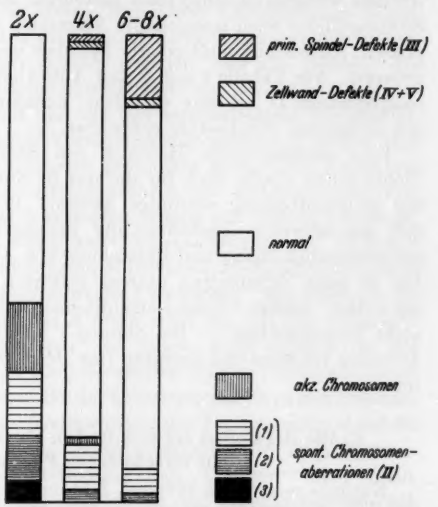


Abb. 1. Graphische Darstellung der prozentuellen Verteilung der Individuen mit verschiedenen Störungen der Pollenmeiose bzw. mit akzessorischen Chromosomen bei Diploiden (n:43), Tetraploiden (n:81), Hexa- und Oktoploiden (n:58) des *Achillea millefolium*-Komplexes (und einiger nahverwandter Arten). Weitere Erklärungen im Text

Aus den Tabellen kann die Abnahme der aberrationslabilen Individuen und bei diesen wiederum die Abnahme der Störungsintensität mit steigender Ploidiestufe sehr klar abgelesen werden. Intra-individuelle Aneuploidie ist bei *Achillea* fast gänzlich auf die diploide Stufe beschränkt und wird offensichtlich ganz überwiegend durch somatische Non-Disjunction ausgelöst. Der enge kausale Zusammenhang mit Störungen der Chromosomenreproduktion geht auch aus der fast vollständigen Korrelation intra-individueller Aneuploidie mit Aberrationslabilität hervor. — Auch das Vorkommen von Individuen mit akzessorischen Chromosomen ist in auffälliger Weise auf die diploiden Kleinarten konzentriert. Bisher wurde nur *eine* Tetraploide mit einem akzessorischen Chromosom aufgefunden. Im Gegensatz zu den Gegebenheiten bei intraindividueller Aneuploidie scheinen sich die

Individuen mit akzessorischen Chromosomen aber eher durch geringere chromosomenreproduktive Labilität auszuzeichnen (vgl. EHRENDORFER 1959b, S. 395; 1959e). Der Zusammenhang mit Störungssyndrom II ist hier besonders durch die Genese der akzessorischen Chromosomen gegeben (vgl. S. 490—491).

Auch *Störungssyndrom III* mit primären, also nicht in Zusammenhang mit exzessiver Fragmentation stehenden Spindelstörungen ist bei *Achillea* weitgehend idiotypisch gesteuert. Als Einzelkomponenten des Störungsbildes seien mangelhafte Verteilung der Elemente in den Anaphasen, Ausbildung multipolarer Spindeln und Restitutionskernbildung genannt. Aus Tabelle 1 und 2 und Abb. 1 ist — im Gegensatz zu Störungssyndrom II — eine deutliche Zunahme der Störungsträger III mit steigender Ploidiestufe erkennbar.

Eine entsprechende Häufung von Störungsträgern auf höheren Ploidiestufen dürfte auch für die nur in Einzelfällen belegten Defekte der Zellwandbildung vermutet werden. Bei *Störung IV* handelt es sich um teilweises Ausbleiben der Zellwandbildung nach der letzten prämeiotischen Mitose und Entstehung von ± fusionierten Doppel-PMZ. Die in ganz vereinzelten extrem gestörten Doppel-PMZ auftretende sekundäre, mäßige Chromosomenfragmentation wurde in den Tabellen nicht berücksichtigt. — Bei *Störung V* ist die Zellwandbildung in den Tetraden teilweise von simultan (für *Achillea* normal) zu sukzedan verschoben.

C. Die Regulation der meiotischen Chromosomenpaarung auf verschiedenen Ploidiestufen

Normale meiotische Bivalent-Bildung ist von Paarung ± homologer Chromosomen und im allgemeinen von Chiasma-Bildung abhängig. Bei den *diploiden* Achilleen sind diese Voraussetzungen allermeist gegeben: Bei mäßiger Chromosomengröße und Chiasma-Interferenz entstehen pro Bivalent immer nur wenige, meist 1—2 in Meta I terminalisierte Chiasmen. Die Chiasma-Frequenz ist biotypenspezifisch verschieden und ± von idiotypischen Steuerfaktoren abhängig[1]. Da Individuen mit gesenkter Chiasma-Frequenz ungepaarte Homologe bilden und dementsprechend Meiosestörungen und Fertilitätssenkung aufweisen, stellt sich in den Populationen ein selektives Gleichgewicht zwischen verschiedenen Syndese-Typen ein (EHRENDORFER 1959b).

Bei *Polyploiden* mit mehreren, ± homologen Genomen kann es infolge Paarung mehrerer Chromosomen nach Partnerwechsel *und* distaler

[1] Die der Chiasma-Frequenz zugrunde liegenden inneren Bedingungen sind noch weitgehend unklar: Crossing-over-Bereitschaft, Synchronisierung der Meiose-Prozesse und der Tapetum-Differenzierung, Spiralisierung der Chromosomen usw. (vgl. dazu etwa GAUL 1954a, HARTE 1956).

Chiasma-Bildung in entsprechenden Chromosomenarmen zur Entstehung von Multivalenten kommen; auch damit sind allermeist Meiosestörungen und ± gesenkte Fertilität gegeben. Die untersuchten polyploiden Achilleen zeigen nun fast ausschließlich auffällig niedere Multivalent-Frequenz. Die Ursachen dafür könnten einerseits in geringer Homologie der Genome dieser Polyploiden (etwa im Zuge fortschreitender struktureller Umbauten durch spontane Chromosomenaberrationen) und entsprechend starker Vorzugspaarung von streng homologen Chromosomen liegen. Diverse cytogenetische Daten (SCHNEIDER 1958, EHRENDORFER 1959b, S. 380 und besonders 1959f) belegen dagegen, daß alle Genome der polyploiden Achilleen weitgehend homolog (also nur genisch bzw. kryptostrukturell differenziert) sind und die fast ausschließliche Bivalentbildung im wesentlichen nicht auf Vorzugspaarung sondern in hohem Maß auf Zufallspaarung und idiotypisch gesteuerte Multivalent-Reduktion bzw. Bivalent-„Absättigung" zurückzuführen ist. Entsprechende Verhältnisse liegen etwa vor bei polyploiden Sippen von *Phleum* (NORDENSKIÖLD 1957), *Oryza* (OKA 1955) und *Triticum* (RILEY und CHAPMAN 1958). Die idiotypische Steuerung der Multivalent-Frequenz muß primär auf Chiasma-Bildung und Partnerwechsel einwirken. Sicherlich ist die geringe Multivalent-Frequenz bei *Achillea* nicht *nur* auf eine reduzierte Chiasma-Frequenz zurückzuführen: In diesem Falle müßten bei der relativ großen Häufigkeit von Ring-Bivalenten bei den Polyploiden auch Multivalente viel häufiger sein. Bei der Steuerung müßte es sich demnach im wesentlichen um eine Interferenzwirkung des Partnerwechsels auf die Chiasma-Bildung handeln: ohne Chiasma-Bildung führt auch Partnerwechsel nicht zur Multivalent-Bildung (vgl. LINNERT 1948, 1949). Eine Verschärfung dieser Interferenz ist bei den Polyploiden wohl allgemein durch die reduzierte Chromosomengröße gegeben. Entsprechend dieser Deutung sind bei polyploiden Achilleen unter normalen Bedingungen infolge Partnerwechsel-Chiasma-Interferenz fast nur Bivalente möglich, bei hoher Chiasma-Frequenz können vereinzelte Multivalente entstehen, bei besonders niederer Chiasma-Frequenz auch sehr vereinzelte ungepaarte Homologe. Die entsprechenden partiellen Korrelationen zwischen Chiasma- und Multivalent-Frequenz sind — ebenso wie bei fast allen anderen daraufhin untersuchten Polyploiden — auch bei *Achillea* gegeben. Bei den Hochpolyploiden bedingt die zunehmende Zahl homologer Chromosomen notwendigerweise auch eine gewisse Zunahme der Multivalent-Frequenz. — Beim Vergleich junger mit alten tetraploiden Sippen bei *Achillea* (*A. roseo-alba*, 4x — *A. collina*, *A. lanulosa*) zeigt sich, daß die Multivalent-Kombination III + I schließlich ± vollständig durch IV ersetzt wird. Diese Tatsache gilt auch für andere Polyploid-Komplexe (etwa *Dactylis:* MCCOLLUM 1958) und ist offensichtlich auf selektiv verstärkte Partnerwechsel-Chiasma-Interferenz

zurückzuführen, wobei erst relativ hohe Chiasma-Frequenzen nach vollständiger II-Bindung auch in Partnerwechsel-Armen noch Chiasmata ermöglichen und daher keine III + I-, sondern ± ausschließlich IV-Figurationen entstehen.

Das charakteristische selektive Balance-System zwischen Biotypen mit verschiedenem Syndese-Verhalten findet sich wohl in den Populationen aller Polyploiden (vgl. etwa MYERS 1943, MCCOLLUM 1958). Die dafür verantwortlichen Systeme idiotypischer Steuerfaktoren können auch in experimentellen Populationen durch Selektion angereichert (GILLES und RANDOLPH 1951, HILPERT 1957; weitere Beispiele bei MCCOLLUM 1958) oder — entsprechend den Verhältnissen bei *Achillea* — durch Inzucht zum Zusammenbruch gebracht werden (MYERS 1948b usw.). Das idiotypische „Rohmaterial" für den Aufbau solcher Regulationssysteme bei den Polyploiden ist vielfach schon in variabler, aber noch nicht erkennbarer Form bei den Diploiden vorgegeben. Dieser Umstand wird durch das unterschiedliche und kaum vorherzusagende Verhalten experimentell hergestellter Polyploider belegt (CHEN, SHEN und TANG 1945; MYERS 1945; CUA 1952c usw.). Bei *Achillea* sei in diesem Zusammenhang nochmals auf das abweichende Verhalten einer 3x *A. crithmifolia* mit auffällig hoher Multivalent-Frequenz hingewiesen (EHRENDORFER 1959b, S. 382), das eine Entsprechung etwa bei cytologisch sehr unterschiedlichen 3x und 4x *Centaurea*-Hybriden findet (GUINOCHET 1957).

D. Die Bedeutung spontaner Chromosomenaberrationen für die Differenzierung der Diploiden

Spontane Defekte der Chromosomenreproduktion, Aberrationen und zugeordnete Störungen des Formwechsels sowie Non-Disjunction und intra-individuelle Aneuploidie gehen bei *Achillea* (und in vielen anderen Fällen) offensichtlich auf Defekte im Eu- und Heterochromatin und letztlich im DNS-Metabolismus zurück; das Ausmaß der Störungen ist biotypenspezifisch verschieden und ± durch Mutatorgene[1] gesteuert (EHRENDORFER 1959b). Schematisch könnte die Wirksamkeit solcher Mutatorgene am ehesten folgendermaßen vorgestellt werden: Angenommen, die normale Chromosomenreproduktion wäre als Reaktions-

[1] Für *Achillea* liegen derzeit noch keine genetischen Analysen vor, die eindeutig belegen, daß die Steigerung der spontanen Chromosomenaberrationsrate durch spezifische Gene bedingt ist. Es muß daher auch mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß der Mutatoreffekt als Ergebnis der Kombination bestimmter Faktoren, eventuell im Zusammenwirken mit einer bestimmten Plasmakonstitution in Erscheinung tritt. Dementsprechend wäre der Begriff Mutatorgen hier in einem erweiterten Sinne zu verstehen, als Bezeichnung für *alle* Faktoren, die in einer bestimmten Ausprägung bzw. in Kombination mit anderen genetischen oder plasmatischen Faktoren einen *Mutatoreffekt* hervorrufen.

kette A→B→C→D→E durch entsprechende Gene gesteuert. Mutiert nun etwa C zu C', so wäre die Reaktionskette gestört, erhöhte Labilität der Chromosomenreproduktion wäre die Folge: C tritt als Mutatorgen (eigentlich Mutator-Allel) in Erscheinung. Die weite Verbreitung von chromosomenreproduktiv labilen Individuen besonders in den diploiden *Achillea*-Populationen zeigt, daß solche Mutatorgene zum Normalbestand des Gen-Reservoirs der untersuchten Sippen gehören. Dabei dürfte sich ganz allgemein ein selektiver Gleichgewichtszustand dadurch einstellen, daß die labilen Individuen zwar die Plastizität der Population erhöhen, gegenüber den stabilen Individuen aber zufolge ihrer ± gesenkten Fertilität im Nachteil sind. — Diese Verhältnisse bei *Achillea* stellen keinen Einzelfall dar. In den letzten Jahren wurden Biotypen mit idiotypisch gesteuerter Labilitätssteigerung der Chromosomen- aber auch der Genreproduktion etwa bei Mais (Beadle 1932d, 1937; McClintock 1953, 1956) und bei *Drosophila* (Ives 1950; Hinton, Ives und Evans 1952; Hinton 1957) cytogenetisch bearbeitet[1]; entsprechende Angaben über gesteigerte Labilität des Plasmons liegen etwa für Hefen vor (James und Spencer 1958).

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die bekannte Tatsache, daß vielfach durch Hybridisierung die Aktivität der Mutatorgene bzw. die Mutationsrate bestimmter Gene gesteigert werden kann (Baur 1933, Stubbe 1935, Harland 1937, Sturtevant 1939, Lamprecht 1944, Renner 1958 usw.); möglicherweise gehören auch die di- und tetraploiden hybridogenen Introgressionspopulationen von *Achillea roseo-alba* mit ihrer relativ hohen Aberrationsrate als Beispiel hierher. Bei Hybriden sind demnach infolge mangelhafter Koordinierung der Steuerfaktoren die zu normaler Gen- und Chromosomenreproduktion führenden Reaktionsketten besonders oft gestört. Diese Tatsache ist von Bedeutung für die Theorie ineinandergreifender Differenzierungs- und Hybridisierungszyklen in der Mikro-Evolution (Ehrendorfer 1958).

Die Annahme von Mutatorgenen als Steuerfaktoren für die spontanen Chromosomenaberrationen bei *Achillea* ermöglicht auch eine ungezwungene Erklärung für die mit zunehmender Polyploidie abnehmende Häufigkeit aberranter Individuen (Tabelle 1 und 2): Da bei Polyploiden mehrere parallele Serien von Steuergenen für normale Chromosomenreproduktion kooperieren, wird mit zunehmender Polyploidie die Wirkung von Mutatorgenen im steigenden Maß durch homologe Normalgene ausgeglichen werden.

Die vielfach festgestellten Korrelationen zwischen Chromosomen- und Genmutationen (vgl. etwa Muller 1956 und die Zusammenfassung bei Swanson 1957, S. 434—437, aber auch kritische Stellungnahmen: Gaul

[1] Weitere, speziell auf Chromosomenaberrationen bezügliche Hinweise finden sich bei Ehrendorfer 1959b, S. 392ff..

1958) unterstreichen die Bedeutung von chromosomenreproduktiv labilen Biotypen für die Differenzierungsphase. Offensichtlich vermag aber nur ein geringer Bruchteil der in der Meiose labiler Formen produzierten neuen Genomtypen die „Filter" der Gametogenese, Befruchtung und Zygotenentwicklung zu passieren, weitere Träger werden infolge geringer Vitalität bzw. Fertilität eliminiert, nur ganz wenige strukturelle Umbauten finden Eingang in die Populationen. Bei *Achillea* sind denn auch tatsächlich die Strukturdifferenzen zwischen verschiedenen Diploiden gering und vielfach kryptisch (EHRENDORFER 1959f); bei anderen Gattungen sind die chromosomenstrukturellen Umbauten viel stärker (etwa bei *Paeonia)* oder führen sogar zu neuen Chromosomenzahlen (etwa bei *Crepis*); in diesen Fällen sind die Zusammenhänge zwischen chromosomenstrukturellem Polymorphismus und spontanen Chromosomenaberrationen deutlicher.

Die funktionelle Bedeutung von strukturellen Umbauten, vor allem im Zusammenhang mit Koppelung von Genkomplexen und Erhaltung von Heterosis-Effekten, ist allgemein anerkannt und durch die weite Verbreitung von Strukturheterozygoten im Tier- und Pflanzenreich erhärtet (GRANT 1954, BRITO DA CUNHA 1955). Bei Populationen von *Trillium* ist etwa chromosomenstrukturelle und morphologische Variabilität korreliert (SAMEJIMA 1958), chromosomenstrukturell stärker variable Populationen von *Drosophila* passen sich rascher und besser veränderten Umweltbedingungen an (BUZZATI-TRAVERSO 1955); *Clarkia franciscana* ist eine Lokal-Art, die offensichtlich unter dem Einfluß von Mutatorgenen eine rapide phylogenetische Differenzierung erfahren hat (LEWIS und RAVEN 1958).

Besondere Bedeutung haben chromosomen(krypto)strukturelle Umbauten als Kreuzungsbarrieren, wobei auf einige neuere Beispiele für experimentellen Barrierenaufbau (STEBBINS und MC COLLUM 1955, PRICE 1955b, GELIN 1956), Introgression von Hybridbarrieren (SMITH 1956, STEBBINS 1957) und cytogenetische Analysen diverser Hybriden (STOUTAMIRE 1955, STEBBINS 1958) hingewiesen sei; daß ganz entsprechende Verhältnisse auch für *Achillea* vorliegen, wird im Beitrag VI zu zeigen sein (EHRENDORFER 1959f). Bemerkenswert sind dabei vor allem die sehr unterschiedlichen Ergebnisse von Kreuzungsversuchen, selbst zwischen Schwesterpflanzen; im Hinblick auf kryptostrukturelle Differenzen als Komponenten von Sterilitätsbarrieren sind also viele Individuen heterozygot, die Populationen dementsprechend polymorph.

Zwischen dem Vorkommen akzessorischer Chromosomen, chromosomenstruktureller Differenzierung und aberrationslabilen Biotypen bestehen enge Beziehungen (vgl. Beispiele aus den Gattungen *Matthiola, Clarkia (= Godetia), Oenothera, Lycopersicum, Tulipa, Fritillaria, Trillium, Paris, Scilla, Allium, Narcissus, Tradescantia, Zea, Secale* und aus einigen

Tiergruppen, z. B. Heuschrecken). Akzessorische Chromosomen entstehen durch Chromosomenaberrationen aus überzähligen Normalchromosomen und sind vielfach besonders anfällig gegen weitere strukturelle Umbauten, Non-Disjunktion, intra-individuelle Aneuploidie usw. (Störungssyndrom II!), was vielfach mit stärkerer Anreicherung von Heterochromatin in Zusammenhang gebracht werden kann. Aus Beitrag V (EHRENDORFER 1959e) ist zu entnehmen, daß diese allgemeinen Feststellungen für diploide Achilleen mit akzessorischen Chromosomen in besonders hohem Maße zutreffen.

Die Daten aus Tabelle 1 und 2 zeigen, daß die Neuentstehung von Chromosomenaberrationen und das Auftreten von zugeordneter intra-individueller Aneuploidie bei den in struktureller Hinsicht nur sehr schwach differenzierten polyploiden Achilleen fortschreitend reduziert wird, wofür die schon oben besprochene reduzierte Aktivität der Mutatorgene verantwortlich gemacht werden muß. Hier spielt also eine andere, vor allem bei Allopolyploiden mit stark differenzierten Genomen gegebene Möglichkeit der Entstehung von Chromosomenaberrationen, nämlich die durch heterogenetische Assoziation mit Crossing-over zwischen nur partiell homologen Chromosomen (vgl. Hinweise bei EHRENDORFER 1959b, S. 393), keine oder nur eine untergeordnete Rolle. Der Ausfall von akzessorischen Chromosomen auf den höheren Ploidiestufen von *Achillea* ist wohl auf die reduzierte Aberrationsrate, daneben aber sicherlich auch auf die funktionelle Bedeutungslosigkeit einzelner Zusatz-Chromosomen gegenüber der Multiplikation ganzer Genome zurückzuführen und findet sich auch bei vielen anderen Angiospermengattungen (DARLINGTON 1956).

Ganz allgemein ist bei Polyploiden infolge der Genom-Vervielfachung die Auswirkung von chromosomenstrukturellen Umbauten abgeschwächt (vgl. etwa MENZEL und BROWN 1954). Besonders wesentlich scheint in diesem Zusammenhang die Abpufferung der Barrierenwirkung. Polyploidie ermöglicht damit vielfach erst die Entstehung von erfolgreichen hybridogenen Kombinationssippen, während die entsprechenden diploiden Hybriden infolge mangelhafter Vitalität und Fertilität nicht oder nur beschränkt konkurrenzfähig sind (vgl. EHRENDORFER 1955 für *Galium*, 1959f für *Achillea*).

Diese bessere Abpufferung erleichtert den Polyploiden auch einen verstärkten Einbau von chromosomenstrukturellen Umbauten. In Abhängigkeit von verschiedenen Voraussetzungen können sich nun aber sehr verschiedene Gleichgewichtszustände zwischen ± verstärktem Einbau und ± abgeschwächter Neuentstehung von Chromosomenaberrationen ergeben; damit sind auch sehr verschiedene Typen von Polyploid-Komplexen möglich. Während bei *Achillea* und in vielen anderen Fällen das Ausmaß der chromosomenstrukturellen Differen-

zierung mit steigender Polyploidie abnimmt, ist bei manchen Komplexen, etwa bei *Solanum*, der *Rumex acetosella*- oder der *Luzula campestris*-Gruppe eher eine Zunahme festzustellen.

E. Spindelstörungen und Defekte der Zellwandbildung als Begrenzungsfaktoren von Polyploid-Reihen

Den primären Spindelstörungen (III) und Zellwand-Defekten (IV und V) ist gemeinsam, daß sie nicht am Chromatin bzw. an den Chromosomen, sondern an Plasma-Elementen in Erscheinung treten; die auslösenden Faktoren sind aber auch hier wohl überwiegend im Genom gelegen (EHRENDORFER 1959c, S. 475). Es ist wohl sicher kein Zufall, daß gerade diese Störungen III, IV und V bei *Achillea* nur bei polyploiden Sippen und hier mit steigender Ploidiestufe in steigender Intensität in Erscheinung treten.

Polyploidisierung führt ganz allgemein zu einer Belastung der normalen Genom-Plasmon-Balance und damit zu erhöhter Störungsanfälligkeit in diesem Bereich. In Mitose und Meiose sind davon verständlicherweise besonders der Spindelapparat und die teilweise zugeordneten Prozesse der Zellwandbildung betroffen. Wie schon im vorhergegangenen Beitrag ausgeführt wurde (EHRENDORFER 1959c, S. 475), treten derartige durch Defekt-Faktoren ausgelöste Störungen zwar schon bei verschiedenen Diploiden auf, vielfach sind sie aber dort nur latent und werden erst im Gefolge der erhöhten Störungsanfälligkeit bei Polyploiden (und auch Hybriden) sichtbar. Die allgemeine Zunahme der Störungen des Spindelapparates und der Zellwandbildung mit steigender Polyploidie wäre demnach nur als eine bestimmte Komponente der fortschreitenden Vitalitätssenkung bei Überschreitung der optimalen Ploidiestufe aufzufassen.

Eine vom phylogenetischen Gesichtspunkt aus wichtige, aber noch weitgehend ungeklärte Frage ist, ob und inwieweit Spindelabnormitäten und Restitutionskernbildung den natürlichen Prozeß der Polyploidisierung bedingen. So sind bei *Achillea* die Ursachen für die fallweise Verdopplung der Chromosomenzahlen in Embryosäcken bzw. Eizellen und in Zygoten bzw. jungen Embryonen noch nicht aufgeklärt (EHRENDORFER 1959b, S. 396; 1959f). Sichergestellt ist in vielen Formenkreisen die Bedeutung von Spindelstörungen bei Polyploiden einerseits für eine gewisse Form der intra-individuellen Aneuploidie und die Abregulierung der Chromosomenzahl (Hinweise EHRENDORFER 1959b, S. 397); solche Phänomene sind bei polyploiden Achilleen bisher nicht festgestellt worden. Andererseits stehen bei vielen polyploiden Angiospermen Spindelstörungen und Restitutionskernbildung in engem Zusammenhang mit apomiktischer Fortpflanzung (GUSTAFSSON 1946—1947). Als cytogenetische Komponenten dieses Fortpflanzungssystems finden

sich Mitotisierung der Pollenmeiose und Diploidisierung der Eizellen schon bei gewissen diploiden, Spindelstörungen und Restitutionskernbildung in PMZ bei polyploiden Achilleen. Bei Berücksichtigung dieser Gegebenheiten und in Anbetracht des Vorkommens apomiktischer Sippen bei den tubulifloren Compositen-Gattungen *Antennaria*, *Arnica*, *Erigeron*, *Eupatorium*, *Parthenium*, *Rudbeckia* u. a. erscheint die Auffindung von polyploiden Apomikten bei *Achillea* durchaus möglich.

F. Versuch einer Synthese

In den voranstehenden Abschnitten wurde versucht, den engen Zusammenhang zwischen den Störungen der Meiose und den Normalprozessen der cytogenetischen Differenzierung als Mechanismen der

Tabelle 3. *Zusammenhänge zwischen Störungen der Meiose und cytogenetischen Mechanismen der Mikro-Evolution bei Achillea*

Störungen der Meiose	Mechanismen der Mikro-Evolution	Diploide ⟶ Polyploide	
I Syndesestörungen	Syndesesteuerung		Reduktion der Multivalent-Frequenz
II Spontane Chromosomenaberrationen	chromosomenstrukturelle Umbauten	Genomdifferenzierung	Verlangsamung
		Kreuzungsbarrieren	Abpufferung
		akzessorische Chromosomen	Ausfall
III Primäre Spindeldefekte			(Abregulierung der Chromosomenzahl, Apomixis)
IV Zellwand-defekte V Zellwand-defekte	gesenkte Fertilität und Vitalität		Begrenzung von Polyploidiereihen

Mikro-Evolution bei *Achillea* darzulegen. Dabei entsprechen der unterschiedlichen Verteilung der Störungen unterschiedliche Evolutionsmechanismen bei Diploiden und Polyploiden[1], wozu man Tabelle 2 sowie Abb. 1 und Tabelle 3 vergleichen möge. In der schematischen Darstellung der Tabelle 3 folgen auf die Störungserscheinungen die entsprechenden Mechanismen der Mikro-Evolution mit ihren wichtigeren Auswirkungen auf der diploiden und polyploiden Stufen. (Die bei *Achillea* nicht festgestellten Mechanismen der Abregulierung der Chromosomenzahl und der Apomixis wurden in Klammer gesetzt.) Im Rahmen der einzelnen Sippen stellen die Populationen Balance-Systeme zwischen Biotypen dar, die sich im Hinblick auf Syndese, Aberrationslabilität,

[1] Vgl. dazu etwa GUSTAFSSON, Acta agric. scand. 4 (1954).

Besitz von akzessorischen Chromosomen, Spindelstörungen usw. unterscheiden; im Rahmen des Gesamt-Komplexes ist ein übergeordnetes Balance-System zwischen Diploiden und Polyploiden gegeben: Die vor allem vom Biotypenreichtum abhängige Plastizität ist bei den Diploiden eher durch Genom-Differenzierung, bei den Polyploiden besonders durch hybridogene Genomkombination gegeben, wobei ursprünglich ausgebildete Kreuzungsbarrieren wieder abgepuffert werden (EHRENDORFER 1959f). Damit ist — wenn auch z. T. mit beschränkten Entwicklungsmöglichkeiten — das allgemeine Prinzip des Differenzierungs-Hybridisierungs-Zyklus gegeben (EHRENDORFER 1958).

Zusammenfassung

1. Die unterschiedliche Verteilung der Störungssyndrome der Pollenmeiose bei Diploiden (2x) und Polyploiden (4x, 6x, 8x) des *Achillea millefolium*-Komplexes und einiger nahestehender Arten (vgl. die speziellen Beiträge EHRENDORFER 1959b und c) wurde auf Grund der cytologischen Analyse von 186 Wildformen quantitativ dargestellt (Tabelle 1 und 2, Abb. 1).

2. Zwischen den Störungserscheinungen und den Normalprozessen der cytogenetischen Differenzierung als Mechanismen der Mikro-Evolution ergeben sich enge Beziehungen. Das „Spektrum" der Störungen und der entsprechenden Evolutionsmechanismen ist bei Diploiden und Polyploiden wesentlich verschieden (Tabelle 3).

3. Als vereinzelte Defekte der normalen meiotischen Bivalent-Bildung treten bei Diploiden ungepaarte Homologe, bei Polyploiden besonders Multivalente in Erscheinung (Störungssyndrom I). Die Syndeseverhältnisse sind weitgehend idiotypisch gesteuert, in den Populationen besteht zwischen normalen und ± gestörten Individuen selektive Balance. Als Ursache für die sehr geringe Multivalent-Frequenz trotz Homologie der Genome dürfte selektive Anreicherung der schon auf der Diploidstufe gegebenen Steuerfaktoren für gesenkte Chiasma-Frequenz und Partnerwechsel-Chiasma-Interferenz anzunehmen sein.

4. Intensität und Verbreitung von spontanen Chromosomenaberrationen und intra-individueller Aneuploidie infolge Non-Disjunktion (Störungssyndrom II) werden mit steigender Polyploidie fortschreitend reduziert; diese Entwicklung muß auf fortschreitende Reduktion der Auswirkung von Mutatorgenen zurückgeführt werden. Die zugeordneten Evolutionsmechanismen der Diploidstufe: divergente Genom-Differenzierung, Ausbildung kryptostruktureller Kreuzungsbarrieren und Entstehung von akzessorischen Chromosomen werden bei den Polyploiden in steigendem Maß durch hybridogene Kombination mit Überbrückung und Abpufferung von Kreuzungsbarrieren ersetzt, wobei die akzessorischen Chromosomen ausfallen. Damit ist — mit gewissen Einschrän-

kungen — auch bei diploiden und polyploiden Achilleen das Prinzip des Differenzierungs-Hybridisierungs-Zyklus gegeben.

5. Primäre Spindelstörungen und Defekte der Zellwandbildung (Störungssyndrome III, IV und V) werden mit steigender Polyploidie immer häufiger; die Ursache dafür dürfte in einer Verstärkung entsprechender idiotypischer Steuerfaktoren durch die verstärkte Labilität der Genom-Plasmon-Relation bei Hochpolyploiden liegen. Mit meiotischen Spindelstörungen, Restitutionskernbildung u. a. sind bei *Achillea* gewisse Vorstufen zu Apomixis gegeben. Anhaltspunkte für eine Abregulierung der Chromosomenzahl der Hochpolyploiden durch Spindelspaltung fehlen.

Literatur[1]

Baur, E.: Artumgrenzung und Artbildung in der Gattung *Antirrhinum*, Sektion *Antirrhinastrum*. Z. Vererb.-Lehre **63**, 256—302 (1933).

Brito da Cunha, A.: Chromosomal polymorphism in the *Diptera*. Advanc. Genet. **7**, 93—138 (1955).

Buzzati-Traverso, A. A.: On the role of mutation rate in evolution. Atti 9. Congr. Intern. Genet., Bellagio 1953, Suppl. Cariologia **1**, 450—462 (1955).

Darlington, C. D.: Chromosome botany. London: G. Allen & Unwin 1956.

Ehrendorfer, F.: Ein Variabilitätszentrum als „fossiler" Hybrid-Komplex: Der ost-mediterrane *Galium graecum* L.-*G. canum* Req.-Formenkreis. Öst. bot. Z. **105**, 229—279 (1958). — Spontane Chromosomenaberrationen und andere Meiosestörungen bei diploiden Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, II.) Chromosoma (Berl.) **10**, 365—406 (1959b). — Spindeldefekte, mangelhafte Zellwandbildung und andere Meiosestörungen bei polyploiden Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, III.) Chromosoma (Berl.) **10**, 461—481 (1959c).

Gaul, H.: Über die gegenseitige Unabhängigkeit der Chromosomen- und Punktmutationen. Z. Pflanzenzücht. **40**, 151—188 (1958).

Gelin, O. E. V.: The meiotic response to the mitotic disturbances in x-rayed barley. Agri Hort. Genet. **14**, 107—126 (1956).

Grant, V.: Chromosome repattering and adaption. Advanc. Genet. **8**, 89—107 (1956).

Guinochet, M.: Quelques remarques sur les relations cytogénétiques entre les *Centaurea montana* L. et *C. triumfetti* All. C. R. Acad. Sci. (Paris) **244**, 1950 bis 1952 (1957).

Harte, C.: Die Variabilität der Chiasmenbildung bei *Paeonia tenuifolia*. Chromosoma (Berl.) **8**, 152—182 (1956).

Hilpert, G.: Effect of selection for meiotic behaviour in autotetraploid rye. Hereditas (Lund) **43**, 318—322 (1957).

Hinton, T., P. T. Ives and A. T. Evans: Changing the gene order and number in natural populations. Evolution **6**, 19—28 (1952).

Ives, P. T.: The importance of mutation rate genes in evolution. Evolution **4**, 236—252 (1950).

[1] Das Literaturverzeichnis enthält nur diejenigen Arbeiten, die noch nicht in den vorhergehenden Beiträgen Ehrendorfer (1959b und c) bzw. im Handbuch von Tischler (1942—1951 und 1953—1957) berücksichtigt wurden.

James, A. P., and P. E. Spencer: The process of spontaneous extranuclear mutation in yeast. Genetics **43**, 317—331 (1958).

Lewis, H., and P. H. Raven: Rapid evolution in *Clarkia*. Evolution **12**, 319—336 (1958).

McCollum, G. D.: Comparative studies of chromosome pairing in natural and induced tetraploid *Dactylis*. Chromosoma (Berl.) **9**, 571—605 (1958).

Menzel, M. Y., and M. S. Brown: The tolerance of *Gossypium hirsutum* for deficiencies and duplications. Amer. Naturalist. 88, 407—418 (1954).

Myers, W. M.: Meiosis of autotetraploid *Lolium perenne* in relation to chromosomal behaviour in autopolyploids. Bot. Gaz. **106**, 304—316 (1945).

Nordenskiöld, H.: Segregation ratios in progenies of hybrids between natural and synthesized *Phleum pratense*. Hereditas (Lund) **43**, 525—540 (1957).

Oka, H.-I.: Studies on tetraploid rice. VI. Fertility variation and segregation ratios for several characters in tetraploid hybrids of rice, *Oryza sativa* L. Cytologia **20**, 258—266 (1955).

Renner, O.: Über den Erbgang des *cruciata*-Merkmals der Oenotheren. VIII. Mitteilung. Verbindungen der *Oenothera atrovirens*, und Rückblick. Z. Vererb.-Lehre **89**, 377—396 (1958).

Riley, R., and V. Chapman: Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. Nature (Lond.) **182**, 713—715 (1958).

Samejima, K.: Evolution and variation in *Trillium*. II. Variation in some external characters observed in natural populations of *Trillium kamtschaticum* Pall. Evolution **12**, 63—71 (1958).

Smith, H. H.: Development of morphologically distinct and genetically isolated populations by interspecific hybridization and selection. Atti 9. Congr. Intern. Genet., Bellagio 1953, Suppl. Cariologia **2**, 867—870 (1956).

Stebbins, G. L.: The hybrid origin of microspecies in the *Elymus glaucus* complex. Proc. Intern. Genet. Symp. 1956. Suppl. Cytologia 336—340 (1957). — The inviability, weakness and sterility of interspecific hybrids. Advanc. Genet. **9**, 147—215 (1958).

—, and G. D. McCollum: The induction of genic and chromosomal sterility in a subspecies hybrid of *Dactylis* by irradiation of pollen. Genetics **40**, 598 (1955).

Stubbe, H.: Über den Einfluß des artfremden Plasmas auf die Konstanz der Gene. Z. Vererb.-Lehre **70**, 161—169 (1935).

Sturtevant, A. H.: High mutation frequency induced by hybridization. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **25**, 308—310 (1939).

Univ.-Doz. Dr. F. Ehrendorfer,
Botanisches Institut der Universität,
Wien III, Rennweg 14

Chromosoma (Berl.) 10, 497—503 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Wien

DIE DNS-REPRODUKTION IN IHRER BEZIEHUNG ZUM ENDOMITOTISCHEN STRUKTURWECHSEL

Von

ELISABETH TSCHERMAK-WOESS

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 29. April 1959)

Die DNS ist bekanntlich ein oder möglicherweise sogar *der* für das Erbverhalten wesentliche und im Normalfall in der Menge konstante Bestandteil der Chromosomen. Es ist nun hinreichend belegt, daß ihre Reproduktion (Verdoppelung) in der Regel während der mitotischen Interphase und nicht, wie man früher annahm, während der Mitose erfolgt (ausführliche Besprechung und Literaturübersicht bei SWIFT 1953a, b und BRACHET 1957). Weiter ist es bekannt, daß ihre Menge in sicher oder offenbar endopolyploiden Geweben mit dem Polyploidiegrad rhythmisch ansteigt (SWIFT 1950, PATAU 1952, MERRIAM und RIS 1954, O'BRIEN 1956). Dies bildet unter anderem *einen* Beweis für die Konstanz je Chromosomensatz. Dabei wurden zunächst nur *Ruhe*kerne berücksichtigt, und zwar teils solche, die sich in Endointerphase befanden, teils solche, in denen die Polyploidisierung schon abgeschlossen war. Die Frage, zu welchem Zeitpunkt des Endomitosezyklus die DNS-Reproduktion erfolgt, wurde bisher noch nicht behandelt. Es war also zunächst offen, ob sie in der Endo*interphase* oder während des endomitotischen *Strukturwechsels* vor sich geht. Die Klärung dieses Problems bildet jedoch eine notwendige Voraussetzung für das kausale Verständnis der Endomitose; sie wurde daher in der vorliegenden Arbeit in Angriff genommen.

Methodik

Zur mikrophotometrischen DNS-Bestimmung auf Grund der Feulgen-Färbung wurde eine Apparatur verwendet, die im wesentlichen nach den Angaben von SWIFT und RASCH (1956) zusammengestellt wurde[1]. Sie besteht aus einem Monochromator (Zeiss M4G II) mit einer Niedervolt-Wolfram-Glühfadenlampe (von 6 V/5 A und einer mittleren Leuchtdichte bei Nennspannung von 1250sb), von dem Licht des sichtbaren Bereiches über einen fixen oberflächenversilberten Spiegel in

[1] Großzügige finanzielle Hilfe leistete hierbei die Rockefeller Foundation. Für vielfältige Unterstützungen und Ratschläge danke ich bestens Herrn Prof. Dr. M. ALFERT.

ein Zeiss-Standard-Mikroskop mit apochromatischer Optik und einem 16fachen Objektiv (Ap. 0,32) als Kondensor geführt wird. Ein beweglicher Spiegel gestattet die Zuführung von Licht einer einfachen Mikroskopierleuchte. An dem Mikroskop ist ein seitlicher binokularer Einblick angebracht, in welchen der Strahlengang durch fallweise Einschaltung eines Prismas umgelenkt wird. Der direkte Strahlengang führt vom Okular über den verstellbaren Balg eines Mikrophotogerätes und ein fixes Rohr, das eine Irisblende enthält, zum Photometerkopf, der unter Verwendung von Teilen des Zeissschen Lichtmeßgerätes aufgebaut ist, einen Elektronenvervielfacher 1 P 21 enthält und nach dem Muster des von SWIFT und RASCH in Abb. 6 skizzierten Photometerkopfes eine abermalige Umlenkung des Strahlenganges in ein seitlich angebrachtes Teleskop mit einem Mikrometer gestattet. Als letzter Bauteil schließt sich schließlich das zum Zeissschen Monochromator gehörige Anzeigegerät an, das außer einem Spiegelgalvanometer mit drei Verstärkungsmöglichkeiten (jede 10fach) die Teile zur Versorgung und Stabilisierung der Glühlampe und des Vervielfachers sowie den Verstärker des Photostromes enthält.

Zur Überprüfung des Instrumentes wurden die von SWIFT und RASCH empfohlenen 5 Teste — darunter unter anderem die DNS-Bestimmung in den Kernen der Mäuseleber — durchgeführt und die geforderte Genauigkeit erreicht.

Nach längeren Vorversuchen in bezug auf ein geeignetes Objekt und eine geeignete Präparationstechnik fiel die Wahl auf die Epidermis des Appendix von *Sauromatum guttatum*, einer Art, bei der die Endomitose schon früher eingehend cytomorphologisch untersucht worden war (TSCHERMAK-WOESS 1954), und zwar wurden kleine, dünne, mit der Hand hergestellte Flächenschnitte in Alkohol-Eisessig fixiert, nach 24 Std in 70% Alkohol übertragen und in diesem 14 Tage belassen zwecks Härtung, die sie gegen die nachfolgende Hydrolyse insofern widerstandsfähig macht, als die Kerne ihre Form behalten, während sie ohne längere Alkoholvorbehandlung zu weich bleiben und bei der Hydrolyse und den nachfolgenden Manipulationen stark deformiert werden. Die Mikrotomtechnik erwies sich nicht als geeignet, da sie bei verschiedener Fixierung neben anderen Nachteilen zum Unkenntlichwerden der endomitotischen Feinstruktur führt. — Die Feulgen-Reaktion wurde entsprechend den Vorschriften von STOWELL am gesamten Material gleichzeitig in Röhrchen durchgeführt.[1] Aus der Bleichflüssigkeit wurden die Schnitte in 45% Essigsäure übertragen und darin über Nacht belassen. Am folgenden Tag wurden sie in 45% Essigsäure auf den Objektträgern ausgebreitet und zum Teil in kleine Stücke zerzupft, mehrmals mit 96% Alkohol abgespült und in Euparal eingebettet. — Es wurden Schnitte von 8 Kolben verschiedenen Alters hergestellt, beginnend mit solchen, in denen die Endomitosetätigkeit gerade begann, bis zu solchen, in denen sie bereits beendet war. Die größten Kerne voll entwickelter Kolben sind schätzungsweise 64- bis 128ploid, so wie die der daraufhin genauer untersuchten Innenepidermis der Spatha (vgl. TSCHERMAK-WOESS 1954). Doch konnten nur die jüngeren, niedriger polyploiden Kerne gemessen werden, da die älteren zu unregelmäßige Umrisse haben.

Die zu messenden Kerne wurden zunächst in einem Forschungsmikroskop ausgewählt, numeriert und in einer Lageskizze festgehalten. Gewöhnlich fanden sich nur am Rande der Gewebestückchen geeignete, einschichtige Zellagen und wurden zunächst Kerne im Höhepunkt des endomitotischen Strukturwechsels aufgesucht und Interphasekerne aus ihrer Umgebung dazugenommen. Die beiden quer zur Blickrichtung verlaufenden Durchmesser der Kerne wurden auf $^1/_2\,\mu$ genau be-

[1] Über die Frage der quantitativen Genauigkeit der Feulgen-Reaktion, vgl. SWIFT (1953, S. 26ff.) und LEUCHTENBERGER.

stimmt und daraus der mittlere Durchmesser gebildet; das Verhältnis der beiden Durchmesser lag zumeist zwischen 1 und 1,2, selten bei 1,3 und höchstens bei 1,4. Da im Unterschied zu manchen tierischen Arten (vgl. GEITLER, zuletzt 1953) bei den Angiospermen die Endomitose sich an weitgehend *ent*spiralisierten Chromosomen abspielt und in ihrem Höhepunkt die Kernstruktur noch homogener ist als während der Interphase, kann die DNS-Menge der einzelnen Kerne auf Grund der Absorptionsmessung bei *einer* Wellenlänge bestimmt werden (zu DNS-Bestimmungen an den *in*homogenen mitotischen Teilungsfiguren ist bekanntlich eine kompliziertere Technik und die Messung bei zwei Wellenlängen nötig — vgl. PATAU und SWIFT sowie die dort zitierte Literatur). Die Kerne von *Sauromatum* sind nicht sehr dicht gebaut, so daß die Absorptionsmessung bei 546 mμ, dem Absorptionsmaximum von Fuchsin durchgeführt werden konnte. Als Spaltbreite wurde 0,3 gewählt. Da es nur auf Relativwerte der Farbstoffmenge ankam, wurde bei *allen* Kernen die Extinktion eines Zylinders ermittelt, dessen Radius (r_A) dem halben Kernradius entsprach. Die relative DNS-Menge pro Kern ergibt sich dann aus der Formel $M_{rel} = r_A{}^2 E$ (vgl. ALFERT 1950). I_o und I_s wurden für jeden Kern zweimal bestimmt und die Kernradien im Teleskopmikrometer der mikrophotometrischen Einrichtung nochmals überprüft; die M_{rel}-Werte von je zwei Messungen differierten um 0 bis höchstens 8%[1]. Die Extinktionen lagen zwischen (0,08) 0,09 und 0,26. — Die Messungen wurden während eines Zeitraumes von $1^1/_2$ Monaten durchgeführt. Am Ende dieser Periode zeigte die Überprüfung von 10 am Beginn untersuchten Kernen einen Abfall von E bzw. M_{rel} auf 75% und ergab die neuerliche Messung von 10 Kernen, die im zweiten Drittel dieses Zeitraumes studiert worden waren, eine durchschnittliche Verringerung von M_{rel} auf 86% des Ausgangswertes. Es mußten daher alle früher gewonnenen Resultate prozentuell umgerechnet werden, um sie mit den zuletzt gewonnenen vergleichen zu können.

Resultate

Wie aus dem Diagramm der Abb. 1b hervorgeht, ergibt die DNS-Menge der Kerne in Endointerphase eine dreigipfelige Verteilung. Da die jüngsten Kerne eben nach Abschluß der Mitosetätigkeit standen, handelt es sich bei ihnen um posttelophasische diploide Kerne; die in ihnen enthaltene DNS-Menge entspricht — nach der üblichen Terminologie — dem 2C-Wert[2]. Die auf das 2C-Maximum folgenden Gipfel liegen beim 4C- und 8C-Wert. Kerne im endomitotischen Strukturwechsel haben DNS-Werte, die sich um zwei Gipfel gruppieren (Abb. 1a)- und diese befinden sich beim 4C- und 8C-Wert. Diese Befunde sind offensichtlich folgendermaßen zu verstehen. In den diploiden, zunächst 2C enthaltenden Interphasekernen erfolgt die Verdopplung der DNS-Menge auf 4C; dann kommt es zur Endomitose, wodurch Tetraplodie hergestellt wird. Die tetraploiden Interphasekerne enthalten zuerst 4C,

[1] Die Hauptursache für diese Differenzen liegt wohl darin, daß sich die Einstellung der Irisblende, mit der ein zentraler Zylinder aus dem Kern herausgeblendet wird, nicht ganz genau reproduzieren läßt.

[2] Dies ist so gut wie sicher, wenn auch der einfache DNS-Gehalt, der sich etwa in jungen einkernigen Pollenkörnern finden müßte, nicht bestimmt wurde.

später 8C, wodurch sie endomitosebereit werden; mit der 8C-Menge gehen sie in die zweite Endomitose ein, welche oktoploide und anfangs 8C enthaltende Interphasekerne ergibt. Um das 4C-Ruhekern-Maximum scharen sich also präendomitotische diploide und postendomitotische tetraploide Kerne, und dementsprechend wird das 8C-Maximum von tetraploiden präendomitotischen und oktoploiden postendomitotischen Kernen gebildet. *Jedenfalls ist also zum Zeitpunkt des endomitotischen Strukturwechsels die DNS-Menge bereits verdoppelt und erfolgt die Reproduktion der DNS während der endomitotischen Interphase.*

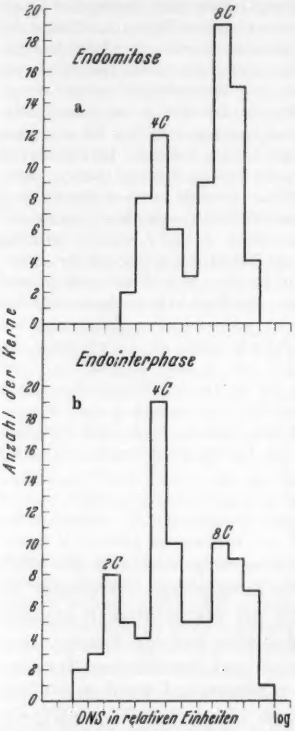


Abb. 1a u. b. *Sauromatum guttatum*, Verteilung der DNS-Menge: a von Kernen im endomitotischen Strukturwechsel, b von Kernen in der endomitotischen Interphase. — DNS in relativen Einheiten logarithmisch auf der Abszisse (Klassen von 0,08), Anzahl der Kerne auf der Ordinate; Mittelwerte (M) numerisch in relativen Einheiten (vgl. im einzelnen den Text)[1]

Das Vorkommen von Zwischenwerten zwischen dem 2C- und 4C-Wert einerseits und dem 4C- und 8C-Wert andererseits bei den *Interphasekernen* entspricht der Erwartung. Denn wenn die DNS während eines

[1] Die beiden nur wenig superponierten Gaußschen Kurven der Abb. 1a lassen sich unter Zuhilfenahme von Häufigkeitspapier einwandfrei aufteilen. Bei dem Diagramm der Abb. 1b sind offensichtlich in der Hauptsache 3 Gaußsche Kurven — entsprechend dem 2-, 4- und 8fachen DNS-Gehalt superponiert, und zwischen ihnen würden sich — bei entsprechendem Zahlenmaterial — noch für eine Reihe von Zwischenwerten niedrigere Gaußsche Kurven einschieben. Eine statistisch einwandfreie Aufteilung in die einzelnen Teilkomponenten läßt sich hier nicht durchführen. Die bei Abb. 1b angegebenen Mittelwerte und Streuungen sind auf Grund einer näherungsweise durchgeführten Aufteilung ermittelt. Infolgedessen mußte auch von der Anwendung des F-Testes zwecks Vergleich der Streuung von endomitotischen und interphasischen Kernen abgesehen werden.

bestimmten Zeitraumes der endomitotischen Interphase reproduziert wird, muß es Zwischenwerte geben, die von Kernen stammen, in denen sich gerade die DNS-Vermehrung abspielt. Nicht der Erwartung entspricht dagegen das Vorkommen von Zwischenwerten bei den Kernen im endomitotischen Strukturwechsel. Sie treten bei diesen jedoch in geringerem Maß auf, und die beiden Teile des Diagramms der Abb. 1a entsprechen deutlich zwei Zufallskurven, so daß man wohl mit Recht annehmen kann, daß das Vorhandensein von Zwischenwerten hier nur methodische — an der Apparatur und im Objekt liegende — Ursachen hat, die sich zufallsgemäß kombinieren und mitunter zu relativ kleinen und großen Werten führen[1]. Als solche kommen vor allem eine gewisse inhomogene Verteilung des chromatischen Materials und auch eine gelegentliche Abflachung der Kerne in Frage.

Die Zwischenwerte stellen also höchstwahrscheinlich bei den endomitotischen Kernen *nur* Streuwerte dar, während sie sich bei den interphasischen Kernen aus Streuwerten *und echten* Zwischenwerten zusammensetzen.

Schlußfolgerung

Aus den vorliegenden Resultaten ergibt sich folgendes. DNS-Reproduktion und chromosomaler Formwechsel folgen im Endomitosezyklus genau so aufeinander wie im Mitosezyklus: der — im Vergleich zur Mitose stark abgekürzte — chromosomale Formwechsel der Endomitose setzt erst ein, wenn die DNS-Menge bereits verdoppelt ist, ebenso wie die mitotischen Vorgänge erst gewisse Zeit nach der DNS-Vermehrung beginnen. Daß es „nur" zu einer Endomitose kommt, kann also nicht daran liegen, daß DNS-Reproduktion und chromosomaler Formwechsel in anderer Weise als bei der Mitose aufeinander abgestimmt sind. Sehr wahrscheinlich besteht aber zwischen anderen stofflichen Komponenten ein Unterschied zwischen *mitose*bereiten und *endomitose*bereiten Kernen. Wie sich im Wurzelmeristem von *Rhoeo discolor* gezeigt hat, ist nämlich zur Mitosebereitschaft eine Zunahme des Kernvolumens auf das 1,8fache des posttelophasischen Ausgangswertes nötig, während die Endomitose bei einer rund 1,4fachen Vergrößerung zustande kommt (Doležal und Tschermak-Woess). Das gleiche gilt hinsichtlich der Mitosebereitschaft auch für *Vicia faba*, *Haemanthus katharinae* und höchstwahrscheinlich ganz allgemein (vgl. Doležal und

[1] Die beiden Teile des Diagramms in Abb. 1a sind noch schärfer getrennt, wenn man kleinere Klassen für die DNS-Menge wählt. Dies schien im Hinblick auf die Genauigkeit der Messung — sie wird im allgemeinen mit 10% angenommen — jedoch nicht angebracht. Bei den hier verwendeten logarithmischen Klassen differieren der entsprechende obere und untere numerische Wert um rund 20% (siehe auch die Fußnote auf S. 500).

TSCHERMAK-WOESS, TSCHERMAK-WOESS und DOLEŽAL-JANISCH 1956, 1957) und hinsichtlich der Endomitosebereitschaft für eine ganze Reihe anderer Arten (TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA, SCHLICHTINGER, STEFFEN 1955, 1956)[1].

Wie PATAU für das eigentliche Meristem und etwas ältere anschließende, bereits endopolyploide Teile der Wurzelrinde von *Rhoeo discolor* festgestellt hat, nehmen im allgemeinen Kernvolumen und DNS-Menge parallel zu. Wenn die an *Sauromatum* gewonnenen Befunde auch auf *Rhoeo* übertragen werden dürfen, was wohl anzunehmen ist, so kommt es vorübergehend zu einer Diskrepanz in diesem Verhältnis, nämlich *vor* und *während* der Endomitose, wenn die DNS-Menge bereits verdoppelt, das Volumen aber noch nicht entsprechend angestiegen ist, also beispielsweise im Zuge eines ersten Endomitosezyklus noch nicht den tetraploiden Wert erreicht hat.

Zusammenfassung

Der DNS-Gehalt endomitotisch heranwachsender Kerne aus der Epidermis des Appendix von *Sauromatum guttatum* wurde auf Grund der Feulgen-Reaktion cytophotometrisch bestimmt. Er hält sich bei jungen Kernen der Endointerphase bei einem Wert von 2C, der offenbar postmitotischen diploiden Kernen zukommt, und bei einem zweifachen (4C) und vierfachen (8C) Wert; diese Werte sind durch Streuwerte und offenbar auch *echte* Zwischenwerte verbunden. Kerne im endomitotischen Strukturwechsel haben eine DNS-Menge von 4C bzw. 8C; echte Zwischenwerte gibt es bei ihnen nicht.

So wie im Zuge der Mitosetätigkeit wird also auch während der Endomitosetätigkeit die DNS-Menge *vor* dem Eintritt des chromosomalen Formwechsels — während der Interphase — reproduziert.

Da das Kernvolumen zur Vorbereitung auf eine Endomitose in der Regel relativ weniger zunimmt als zur Vorbereitung einer Mitose, müssen andere stoffliche Faktoren als der DNS-Gehalt dafür maßgebend sein, welcher dieser beiden Vorgänge zustande kommt.

Literatur

ALFERT, M.: A cytochemical study of oogenesis and cleavage in the mouse. J. cell. comp. Physiol. **36**, 381—410 (1950).

BRACHET, J.: Biochemical Cytology. New York: Acad. Press. Inc. 1957.

DOLEŽAL, RUTH, u. ELISABETH TSCHERMAK-WOESS: Verhalten von Eu- und Heterochromatin und interphasisches Kernwachstum bei *Rhoeo discolor*; Vergleich von Mitose und Endomitose. Öst. bot. Z. **102**, 158—185 (1955).

[1] Bei den letzteren Autoren nicht in dieser Form angeführt, aber aus den Tabellen zu ermitteln.

GEITLER, L.: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. Protoplasmatologia, Vol. 6 C. Wien: Springer 1953.

MERRIAM, R. W., and HANS RIS: Size and DNA content of nuclei in various tissues of male, female, and worker honeybees. Chromosoma (Berl.) **6**, 522—538 (1954).

O'BRIEN, REGINA: Deoxyribose nucleic acid in a haploid-diploid species (*Steatococcus tuberculatus* MORRISON). Chromosoma (Berl.) **8**, 229—259 (1956).

PATAU, K.: The DNA content of nuclei in root tips of *Rhoeo discolor* (abstract). Genetics **37**, 612 (1952).

—, and H. SWIFT: The DNA-content (Feulgen) of nuclei during mitosis in a root tip of onion. Chromosoma (Berl.) **6**, 149—169 (1953).

SCHLICHTINGER, F.: Karyologische Untersuchungen an endopolyploiden Chromozentrenkernen von *Gibbaeum heathii* im Zusammenhang mit der Differenzierung. Öst. bot. Z. **103**, 485—528 (1956).

STEFFEN, K.: Kern- und Nukleolenwachstum bei endomitotischer Polyploidisierung. (Ein Beitrag zur karyologischen Anatomie von *Pedicularis palustris* L.) Planta **45**, 379—394 (1955). — Endomitosen im Endosperm von *Pedicularis palustris*. Planta **47**, 625—652 (1956).

STOWELL, R. E.: Feulgen reaction for thymonucleic acid. Stain Technol. **20**, 45—58 (1945).

SWIFT, H.: The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **36**, 643—654 (1950). — Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. Int. Rev. Cytol. **2**, 1—76 (1953a). Nucleoproteins in the mitotic cycle. Tex. Rep. Biol. Med. **11**, 755—774 (1953b).

—, and ELLEN RASCH: Microphotometry with visible light. In: Physical techniques in biological research, Vol. 3, pp. 353—400. Herausgeg. von G. OSTER u. A. W. POLLISTER. New York: Acad. Press Inc. 1956.

TSCHERMAK-WOESS, ELISABETH: Über die Phasen der Endomitose, Herkunft und Verhalten der „Nuclealen Körper" und Beobachtungen zur karyologischen Anatomie von *Sauromatum guttatum*. Planta **44**, 509—531 (1954).

—, u. RUTH DOLEŽAL-JANISCH: Rhythmisches Kernwachstum während der mitotischen Interphase von *Vicia faba*. Öst. bot. Z. **103**, 588—599 (1956). — Über das Chromosomen- und Kernwachstum in der Wurzel von *Haemanthus*. Chromosoma (Berl.) **9**, 81—90 (1957).

—, u. GERTRUDE HASITSCHKA: Veränderungen der Kernstruktur während der Endomitose, rhythmisches Kernwachstum und verschiedenes Heterochromatin bei Angiospermen. Chromosoma (Berl.) **5**, 574—614 (1953).

Prof. Dr. ELISABETH TSCHERMAK-WOESS
Botanisches Institut der Universität
Wien III, Rennweg 14

Chromosoma (Berl.) 10, 504—514 (1959)

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Beermann, Tübingen

CHROMATIN-DIMINUTION BEI COPEPODEN

Von

Sigrid Beermann

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. April 1959)

Unter den bekannten Fällen der chromosomalen Soma-Keimbahn-Differenzierung nimmt die Chromatin-Diminution bei *Ascaris* eine Sonderstellung ein. In den ersten Teilungen der Soma-Stammzellen werden bei *Ascaris* statt überzähliger ganzer Chromosomen (vergleiche die Verhältnisse bei Sciariden, Orthocladiinen, Cecidomyiden) distale heterochromatische Chromosomenteile in das Cytoplasma ausgestoßen (Boveri 1899). Dieser Vorgang, der gesetzmäßige Verlust von feulgen-positiven Chromosomenbestandteilen, ist außer bei den Ascarinen *(Nematodes)* bisher nirgends beobachtet worden. Er gilt in erster Linie deshalb als Sonderfall, weil bei *Ascaris megalocephala (Parascaris equorum)*, der einzigen cytologisch gut analysierbaren Spezies, auch das euchromatische Mittelstück in zahlreiche Teile zerbricht, wenn die Enden „diminuiert" werden. Wie in dieser Mitteilung gezeigt werden wird, ist die Chromatin-Diminution nicht auf die Nematoden beschränkt; sie kommt vor bei *Cyclops strenuus* und verschiedenen anderen Copepoden. Der Vorgang erweist sich als weniger kompliziert als bei *Ascaris*, und es erscheint hier möglich, den Mechanismus der Diminution auch experimentell aufzuklären.

Das Auftreten von überschüssigem Chromatin in den Furchungsteilungen von *Cyclops strenuus* wurde schon früher beobachtet, aber falsch gedeutet. So beschreibt Häcker (1894) eine „da und dort auftretende Chromatinabspaltung" auf dem 16-Zellenstadium. Er betrachtet sie jedoch als eine pathologische Erscheinung. Stich (1953) meint zu den entsprechenden cytologischen Bildern, es würden von „distalen heterochromatischen Chromosomenteilen DNS-haltige Grana während der Prophase in den Kernsaft abgestoßen". Beiden Autoren entging das abweichende Verhalten der Urkeimzelle, das den Ausgangspunkt bildet für die Parallele mit *Ascaris*.

1. Die Chromatin-Diminution bei Cyclops strenuus „grün"[1]

Bis zum Ende der 4. Furchung von *C. strenuus* „grün" verlaufen die Teilungen in allen Zellen, einschließlich der Keimbahnzellen, die

[1] Diese Species der *Cyclops-strenuus*-Gruppe (=Gattung *Cyclops s. str.*) trat massenhaft in dem Dorfteich von Cappel bei Marburg auf. Sie wurde deshalb in erster Linie zu den Untersuchungen herangezogen. Nach freundlicher Mitteilung von Herrn Dr. H. Herbst, Krefeld, handelt es sich bei *C. strenuus* „grün" wahrscheinlich um *C. strenuus divulsus* Lindberg 1956.

durch die Ektosomen im Plasma gekennzeichnet sind, synchron und normal. Es werden keine chromosomalen Besonderheiten beobachtet. Die Teilungen folgen einander im Abstand von einer Stunde (20° C). In der späten Telophase der 4. Furchungsmitose beginnt sich das Verhalten der Kerne zu ändern: Nukleolen und Chromozentren bilden sich aus. Zum ersten Male in der Individualentwicklung manifestiert sich damit das Vorhandensein von Heterochromatin, und zwar in allen 16 Blastomeren-Kernen. Die Chromozentren entstehen in der Kern-

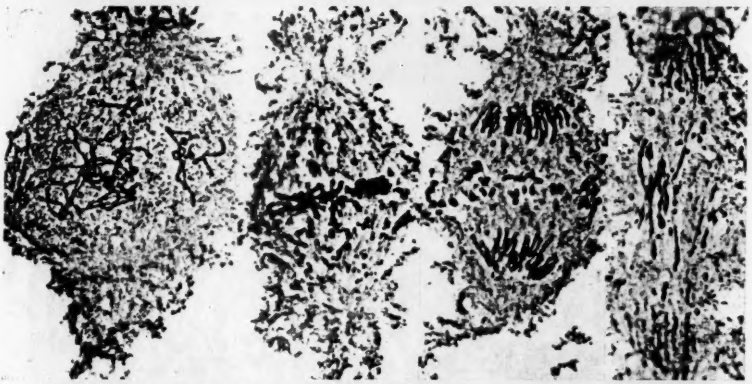


Abb. 1. Ablauf der Diminutions-Mitose bei *Cyclops strenuus* „grün". Von links nach rechts: Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase. Näheres im Text. 600 ×

hälfte gegenüber dem Spindelpol und weisen damit auf die distale Lage der heterochromatischen Chromosomenabschnitte hin. In zwei Kernen bleibt dieses Bild während der ganzen nun folgenden 3—4stündigen Interphase erhalten. Dies sind die Kerne der Urkeimzelle und der „Ur-Entodermzelle", die sich von jetzt ab nicht mehr synchron mit den übrigen teilen (Amma 1911). In den restlichen 14 Kernen laufen Veränderungen ab, die im einzelnen noch nicht präzisiert werden können. Sie enden damit, daß die Chromozentren kurz vor der Prophase des 5. Teilungsschrittes vollständig verschwunden sind. Die Kerne erscheinen dabei stark verquollen. Erst im Beginn der Prophase (Abb. 1) werden mit den Chromosomen wieder Strukturen in den Kernen erkennbar (Technik: Orcein-Milchsäure-Quetschpräparate, Phasenkontrast).

Die Prophase-Chromosomen besitzen keine heterochromatischen Abschnitte. Der Kernraum ist mit feinsten Chromatinpartikeln gleichmäßig erfüllt. In der Metaphase konzentrieren sich die Chromatinpartikel um die Spindelpole. In der frühen Anaphase sammeln sie sich in der Äquatorebene und verschmelzen zu Chromatinschollen. Diese

wandern nach den Chromosomen in Richtung auf die Spindelpole und bleiben dann außerhalb der Telophase-Kerne im Plasma liegen (vgl. Abb. 1 und STICH 1953). Die Kerne selbst weisen keine Chromozentren mehr auf. Während dieser „Diminutions"-Teilungen verharren die Ur-Entodermzelle und die Urkeimzelle, wie oben erwähnt, in der Interphase. Sie beginnen sich zur Teilung erst vorzubereiten, wenn der 5. Furchungsschritt in den anderen Zellen abgeschlossen ist. Die Ur-Entodermzelle holt die Diminutionsmitose in der oben beschriebenen Weise nach.

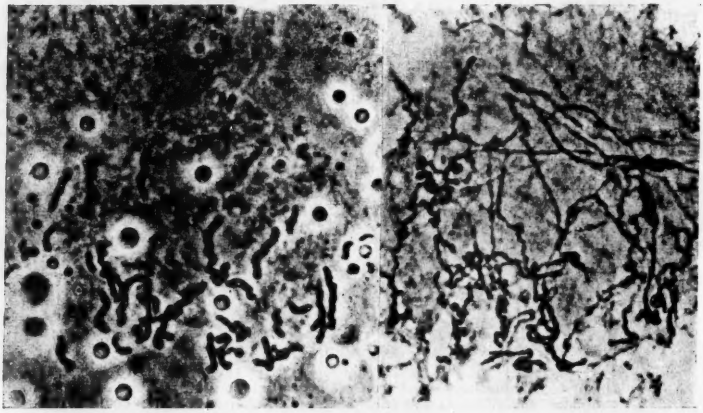


Abb. 2. Prophase der Urkeimzelle von *C. strenuus* „grün" in der 5. Furchung. Links: sehr frühe Prophase, nur die heterochromatischen Chromosomenabschnitte gut erkennbar (Frischpräparat). Rechts: Ausschnitt aus späterer Prophase, Euchromatin erkennbar (Dauerpräparat). Beide 1120 ×

Ganz anders dagegen verhält sich die Urkeimzelle. Ihre Chromozentren werden nicht aufgelöst, sondern bleiben bis zur Prophase unverändert sichtbar. Aus den Chromozentren bilden sich anschließend heterochromatische Chromosomen-Endabschnitte (vgl. Abb. 2). Kernraum und Spindel sind die ganze Mitose hindurch von Chromatinpartikeln oder -schollen frei. Die zwei aus der Teilung hervorgehenden Urkeimzellen, die sich bis zum Schlüpfen des Nauplius nicht mehr teilen, zeichnen sich gegenüber den somatischen Zellen durch ihre dicken Chromozentren aus.

Die Beobachtung, daß die somatischen Zellkerne nach der 5. Furchungsteilung im Gegensatz zu den beiden Urkeimzellen keine Chromozentren mehr aufweisen, rechtfertigt den Verdacht, daß die Chromatin-Partikel in den „Diminutionsmitosen" nichts anderes sind als die zerfallenen Chromosomen-Endabschnitte, die in der Keimbahn unverändert erhalten bleiben. Ob diese Hypothese zutrifft, läßt sich an Hand der

Furchungsteilungen allein nur schwer entscheiden. Als besonders aufschlußreich erweist sich in dieser Beziehung das Diplotän von *C. strenuus* „grün".

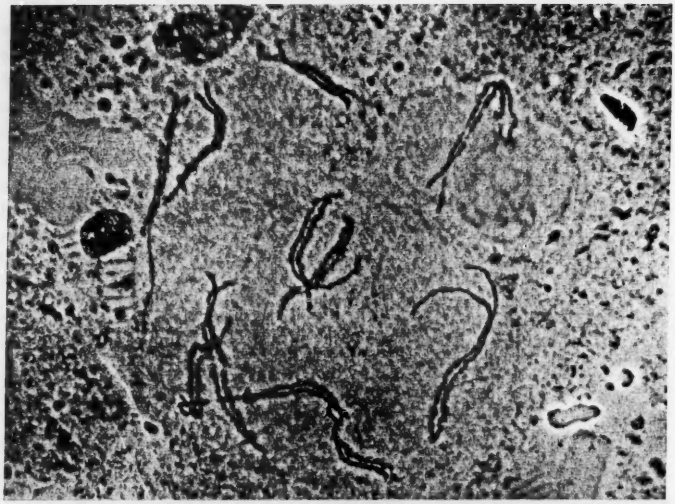
2. Die Diplotän-Chromosomen

Im Diplotän der wachsenden Oocyten von *C. strenuus* „grün" ist der Aufbau der 11 Chromosomenpaare besonders deutlich zu erkennen (Abb. 3). Wie bei vielen anderen Copepoden unterscheidet sich das Bild dieses Diplotäns von einem normalen zunächst dadurch, daß die Chiasmen fehlen. Die Bivalente erscheinen über die ganze Länge „auf Distanz" gepaart. Darüber hinaus tritt nun bei *C. strenuus* „grün" auf dem Höhepunkt des Oocytenwachstums die Gliederung der Chromosomen in Eu- und Heterochromatin in besonders klarer Weise hervor. Das Euchromatin erscheint diffus, lampenbürstenartig und häufig stark verquollen. Der Spindelansatz ist nicht zu erkennen. Das Heterochromatin dagegen ist kompakt, entsprechend intensiv gefärbt, mit glatten Konturen, und in jedem Partner deutlich in zwei Chromatiden gespalten. Jedes der 22 Chromosomen besitzt einen euchromatischen Mittelabschnitt und heterochromatische Endabschnitte. Der heterochromatische Anteil übertrifft in seiner Länge häufig den euchromatischen, so daß der Chromosomensatz insgesamt etwa gleich viel Eu- und Heterochromatin aufweist.

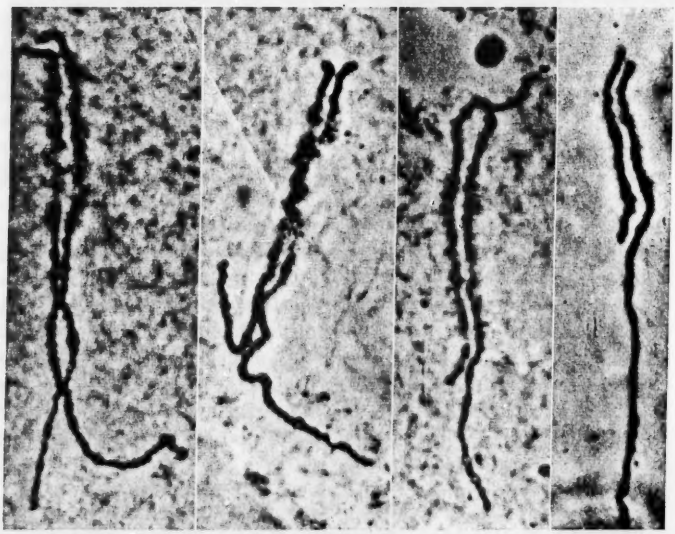
Die beiden Partner eines Bivalents stimmen in der Ausdehnung des euchromatischen Mittelabschnitts stets miteinander überein. Die heterochromatischen Endabschnitte können dagegen an einem oder an beiden Enden des Bivalents verschieden lang sein (Abb. 3). Bei 3 ♀♀ von *C. strenuus* „grün" waren sogar über ein Viertel aller Bivalent-Enden verschieden lang und nur höchstens die Hälfte der Enden eindeutig gleich. Die Strukturverschiedenheiten sind nicht zufällig, sondern sicher genetisch bedingt, denn der Chromosomensatz bietet in den verschiedenen Oocyten eines Tieres das gleiche Bild. Von Tier zu Tier dagegen können die Verhältnisse wechseln. Die Chromosomen im Diplotän nach der relativen Länge der eu- und heterochromatischen Abschnitte zu charakterisieren ist daher nur mit Einschränkung möglich. Nur das Nukleolenchromosom läßt sich mit Sicherheit in allen Tieren identifizieren. Es trägt an dem einen Ende den Nukleolus, an dem anderen Ende besitzt es heterochromatische Abschnitte, und außerdem zeigt es ein kleines Stück interkalares Heterochromatin.

3. Die Chromosomen in den Furchungsteilungen

Aus der beschriebenen Heterozygotie der Diplotänchromosomen folgt, daß Längenunterschiede zwischen homologen Chromosomen auch in den Furchungsteilungen auftreten sollten. Diese müßten später in den



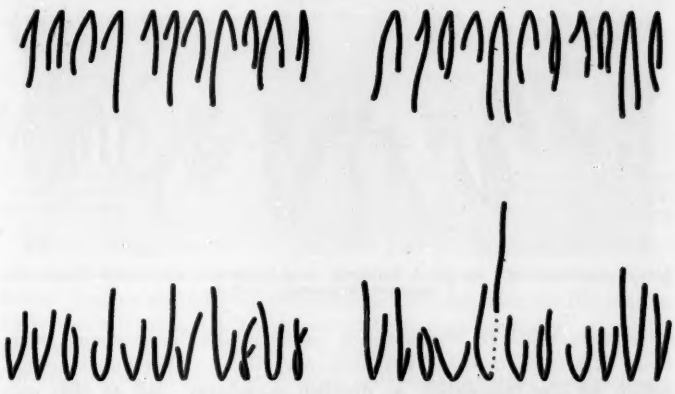
a



b

Abb. 3 a u. b. Diplotän der Oocyten von *C. strenuus* „grün". a Ganzer Kern mit 11 Bivalenten. b einzelne Bivalente aus verschiedenen Kernen. Euchromatin zerfasert, lampenbürstenartig, Heterochromatin glatt, zum Teil deutlich in Chromatiden gespalten. Auffällige Heterozygotie in der Länge der heterochromatischen Endabschnitte. Oben 800 ×, unten 2000 ×

somatischen Zellen durch die Chromatin-Diminution aufgehoben werden unter der Voraussetzung, daß die Chromatinpartikel der 5. Furchungsteilung die zerteilten heterochromatischen Chromosomenenden sind.



Genügend deutliche Längenunterschiede zwischen homologen Furchungschromosomen bedeuten also eine Möglichkeit, den Verlust der Chromosomenenden direkt morphologisch nachzuweisen. Versucht man, in den Furchungsteilungen die Chromosomen des väterlichen und des mütterlichen Satzes paarweise zu ordnen, so gelingt das nicht vollständig. Es bleiben stets Chromosomen übrig, die nicht zusammenpassen. In der Abb. 4 ist eine späte Anaphase der 2. Furchungsteilung gezeigt. Durch die Gonomerie in der Spindel liegen väterlicher und mütterlicher Chromosomensatzgetrennt. Der Unterschied zwischen den Chromosomensätzen wird dadurch bei einem Vergleich besonders deutlich. Zu 7 Chromosomen des einen Elter lassen sich 7 des anderen zuordnen. Dagegen finden 4 Chromosomen in jedem der beiden Sätze keinen gleichen Partner im anderen Satz. Besonders fallen die beiden großen gleichschenkligen Chromosomen der rechten Gruppe in Abb. 4

Abb. 4. Späte Anaphase aus der 2. Furchung von *C. strenuus* „grün", nicht gequetscht. Chromosomen der beiden gonomeren Sätze einzeln nebeneinander herausgezeichnet, schematisiert (vgl. Photo). Näheres im Text. Photo 1100 ×, Zeichnung 1300 ×

auf. Die Abb. 5 zeigt eine Anaphasehälfte aus der 4. Furchungsteilung, diesmal ohne erkennbare Gonomerie. Eine vollständige paarweise Anordnung gelingt auch hier nicht, obwohl ohne Trennung der Chromo-

Abb. 5. Anaphasehälfte aus der 4. Furchung, ohne Gonomerie, gequetscht. Mindestens 1 unpaares Chromosom. 1500 ×

somensätze beliebige Möglichkeiten bestehen, die Chromosomen paarweise zusammenzustellen. Die Heterozygotie der Furchungschromosomen ist also tatsächlich so deutlich ausgeprägt, daß es sich ent-

Abb. 6. Metaphase der Diminutions-Mitose (5. Furchung) von *C. strenuus* „grün", auseinandergedrückt. Diminuiertes Heterochromatin in Form von Chromatinpartikeln in der Spindel verstreut. N_1 und N_2 Nukleolenchromosomen mit unspiralisiertem, terminalen Nukleolenchromatin. H_1 und H_2 „Hakenchromosomen" mit knopfartigem kurzem Arm. 1400 ×

scheiden lassen muß, ob sie (als Folge der Diminution) aufgehoben wird oder nicht.

Nach der Diminution sind die Chromosomen wesentlich kleiner als vorher. Das ist der erste Hinweis auf einen Chromatinverlust. Die Chromosomen lassen sich jedoch außerdem zu zwei gleichen Sätzen von 11 Chromosomen ordnen (Abb. 6 und 7). Eindeutige Ungleichheiten sind niemals festzustellen. Man kann allerdings nicht ausschließen, daß ungleiche Paare nicht doch noch vorhanden sind, zumal da keine gonomere Anordnung mehr vorliegt; die Chromosomen könnten falsch ge-

ordnet worden sein. Zum Glück findet sich ein Chromosomenpaar, an welchem sich die Veränderung direkt nachweisen läßt. Es ist durch ein extremes Schenkellängen-Verhältnis ausgezeichnet. Der lange Arm ist

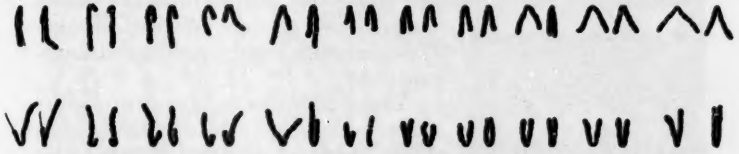


Abb. 7. Chromosomen aus der mittleren Anaphase einer Diminutionsteilung von *C. strenuus* „grün", paarweise der Größe und Gestalt nach geordnet. Von links nach rechts: Nukleolenchromosomenpaar, „Hakenchromosomen"-Paar, 4 Paare ungleichschenkliger Chromosomen, 5 Paare nahezu gleichschenkliger Chromosomen. 1100 ×

(in Anaphasen) stets mindestens fünfmal so lang wie der knopfartig kurze. In allen analysierbaren somatischen Mitosen nach der Diminution findet sich dieses „Hakenchromosom" immer eindeutig paarweise (vgl. Abb. 6 und 7). Vor der 5. Furchungsteilung dagegen konnte ein derartiges Chromosomenpaar niemals beobachtet werden. Vergleichbare Chromosomen, deren Schenkellängen-Verhältnis zwischen 3:1 und 5:1 liegt, treten gelegentlich in der Einzahl auf. Diese Beobachtungen können nur bedeuten, daß der kurze Arm des „Hakenchromosoms" vor der Diminution in der Regel wesentlich länger ist. Seine Verkürzung wird am einfachsten durch den Verlust des heterochromatischen Endabschnittes erklärt.

Die Befunde in ihrer Gesamtheit dürfen als Beweis für die bereits formulierte Hypothese gelten, daß die in der 5. Furchungsteilung der somatischen Zellen auftretenden Chromatinpartikel Zerfallsprodukte der heterochromatischen Chromosomenenden sind.

4. Befunde bei anderen Copepoden

Der Vorgang der Chromatin-Diminution findet sich nicht nur bei *C. strenuus* „grün", sondern bei allen bisher untersuchten Spezies der Gattung *Cyclops* s. str. (vgl. Fußnote S. 504). Andere Vertreter der Cyclopiden, darunter *C. viridis*, *C. albidus*, *C. serrulatus*, *C. fuscus*, *C. phaleratus* und *C. varicans*, wurden ebenfalls untersucht. Nur bei *C. varicans* konnten Diminutions-Vorgänge in der Furchung beobachtet werden. Mit Sicherheit kommt überschüssiges Keimbahn-Chromatin auch bei *Canthocamptus staphylinus* (Fam. *Harpacticidae*) vor. Den Hinweis gibt hier eine Abbildung von Amma (1911), in welcher eine „pathologische" Furchungsmitose dargestellt ist. Außerdem wurden auf späteren Stadien der Embryonalentwicklung Chroma-

tinmassen in den Kernen der Urkeimzellen beobachtet, die den somatischen Kernen fehlen (eigener Befund). Die Beobachtung von Keimbahn-Chromatin in so verschiedenen Formen wie *Cyclops* und *Canthocamptus* läßt es möglich erscheinen, daß die in dieser Arbeit beschriebene Art der Soma-Keimbahn-Differenzierung bei Copepoden weiter verbreitet ist.

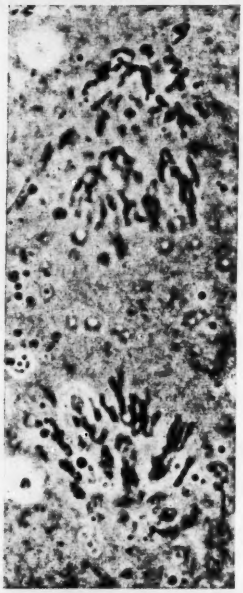


Abb. 8. Diminutions-Anaphase von *C. strenuus* „gelb". Chromatin-Partikel an den Polen statt am Äquator. 1000 ×

Einige der näher untersuchten Spezies der *strenuus*-Gruppe weichen in Einzelheiten von *C. strenuus* „grün" ab. So bleibt bei einer Form aus St. Andrews (Schottland) das Heterochromatin auch im Diplotän zu einem großen Chromozentrum verschmolzen. Bei einer anderen Spezies aus der Umgebung von Marburg (*C. strenuus* „gelb" = *C. strenuus strenuus* FISCHER 1851, nach Herrn Dr. HERBST, Krefeld) ist das Diplotän für die Chromosomen-Analyse ebenfalls ungeeignet. Das Heterochomatin erscheint hier stark aufgelockert. In den Diminutionsteilungen dieser Form bleiben die Chromatinpartikel immer an den Spindelpolen liegen (Abb. 8). Eine besonders interessante Abweichung zeigt eine weitere Spezies aus der Umgebung von Marburg, die durch ihr rotes Pigment auffällt (*C. strenuus* „rot" = *C. furcifer* CLAUS 1857). Hier haben die Chromosomen Heterochromatin nicht nur an den Chromosomenenden, sondern auch am Kinetochor. Außerdem ist der Diminutionsvorgang von dem 5. auf den 6. Furchungsschritt verschoben. Das hat zur Folge, daß die Verteilung von Eu- und Heterochromatin außer im Diplotän auch in der 5. Furchungsteilung deutlich zu sehen ist (Abb. 9). Die Diminution hat ein überraschendes Ergebnis: Es scheint auch das Kinetochoren-Heterochromatin zu verschwinden. Jedenfalls zeigen die wenigen bisher untersuchten Mitosen nach der Diminution nur gleichmäßig euchromatische Prophasechromosomen (Abb. 10). Auch die Interphase-Kerne haben nur in den beiden großen Urkeimzellen deutliche Chromozentren.

Sollte sich der Befund bei *C. furcifer* bestätigen, so ließen sich Schlußfolgerungen nicht umgehen, die für den Mechanismus der Diminution

Abb. 9. Prophase der 5. Furchungsteilung von *C. strenuus* „rot" *(C. furcifer)*. Heterochromatin auch an den Kinetochoren. 1330 ×

wie auch für die Theorie der Chromosomenstruktur von Bedeutung wären. Man müßte fordern, daß die Diminution im Loslösen von „Chromatin" von einem durchlaufenden Achsenfaden besteht (BAUER 1953, vgl. auch die Modellvorstellungen von TAYLOR 1957). Die Verlagerung von Heterochromatin in rein euchromatische Bereiche, mit Hilfe röntgeninduzierter Inversionen, sollte dann die Kontinuität des Chromosoms nach der Diminution nicht aufheben. Entsprechende Versuche sind eingeleitet.

Abb. 10. Somatische Prophase der 7. Furchung von *C. strenuus* „rot" *(C. furcifer)*. Gleiche Vergrößerung wie Abb. 9! 1330 ×

Summary

1. The somatic chromosomes of *Cyclops strenuus* and of some othes Copepoda become different from those of the germ line cells by a procers of chromatin diminution similar to the classical case of *Ascaris*.

2. The germ line cells investigated include primordial germ cells of the 5th cleavage division and oocytes in diplotene. In the germ line all 22 chromosomes terminate in long heterochromatic sections, as a rule in both arms. Large differences in the length of the heterochromatin may occur between homologous chromosomes.

3. Subsequent to the 4th or the 5th cleavage division, depending on the species, heterochromatin is no longer demonstrable in the chromo-

somes of the somatic cells. This is shown to result from the disintegration and loss of the heterochromatin during prophase of the 5th, or 6th, cleavage division of the somatic stem cells. No such diminution is observed in the primordial germ cells.

4. The possibility of loss of interstitial heterochromatin, without subsequent fragmentation of the chromosome, will be further investigated.

Literatur

AMMA, K.: Über die Differenzierung der Keimbahnzellen bei den Copepoden. Arch. Zellforsch. **6**, 497—576 (1911).

BAUER, H.: Die Chromosomen im Soma der Metazoen. Zool. Anz. Suppl. **17**, 252—268 (1953).

BOVERI, TH.: Die Entwicklung von *Ascaris megalocephala* unter besonderer Berücksichtigung der Kernverhältnisse. Festschrift für C. v. KUPFFER, Jena 1899.

HÄCKER, V.: Über generative und embryonale Mitosen, sowie über pathologische Kernteilungsbilder. Arch. mikr. Anat. **43**, 759—787 (1894).

STICH, H.: Stoffe und Strömungen in der Spindel von *Cyclops strenuus*. Ein Beitrag zur Mechanik der Mitose. Chromosoma (Berl.) **6**, 199—236 (1953).

TAYLOR, J. H.: The time and mode of duplication of chromosomes. Amer. Naturalist **91**, 209—221 (1957).

SIGRID BEERMANN-PAGEL,
Max-Planck-Institut für Biologie,
Tübingen, Spemannstr. 34

Chromosoma (Berl.) 10, 515—534 (1959)

From the Zoological Laboratory, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, and the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Mass.

CHROMOSOME BEHAVIOR AND CELL LINEAGE IN TRIPLOID AND MOSAIC SALIVARY GLANDS OF SPECIES HYBRIDS IN SCIARA

By

C. W. METZ

With 4 Figures in the Text

(Eingegangen am 24. April 1959)

In the course of cytogenetic studies on *Sciara* in our laboratory considerable work has been done on hybrids between *Sciara ocellaris* COMSTOCK and *S. reynoldsi* METZ. Preliminary accounts dealing with genetic behavior, salivary gland chromosome behavior and taxonomy are given by METZ and LAWRENCE (1938) and METZ (1938a). Among the scores of salivary gland preparations made in these studies are three from hybrid larvae which were evidently triploid in chromosome constitution. And one of the three was a chromosomal mosaic. These preparations are especially useful in our comparative studies on the make-up (band pattern) of homologous chromosomes in the two species. But, due in part to an unusual combination of circumstances, they also exhibit phenomena which help to throw light on several other topics or problems, to which the present paper will be devoted. For comparison some hitherto undescribed diploid mosaics will also be considered.

No attempt will be made to review the extensive literature on hybrid chromosome studies. Aside from previous observations on *Sciara*, which will be referred to below, only two studies bear closely enough on the present work to require attention, so far as known to the writer. BEERMANN (1953) has reported briefly the occurrence, in the F_2 from a species cross in *Chironomus*, of triploid individuals which received a diploid set of chromosomes through the sperm and a haploid set through the egg. The points of interest in that case, however, appear to be different from those dealt with in the present paper. More recently DOBZHANSKY (1957) has described phenomena in diploid *Drosophila* hybrids which are closely paralleled by those in our material, as regards the behavior of the X chromosomes in males. This work will be considered below in the section on sex chromosomes.

The two species, *S. ocellaris* and *S. reynoldsi*, are very closely related, as shown by their likeness in external morphology and by the fact that

they will hybridize. Yet they are distinct species, giving sterile hybrids (see METZ 1938a; METZ and LAWRENCE 1938). In view of the fact that we have no method for inducing triploidy at will in *Sciara*, and have to depend upon the sporadic appearance of material like that under consideration for the special kinds of evidence it affords, the descriptive part of the present account will be given in some detail in order to make the data available. Determination of "sex" in the three specimens involved here is based entirely on chromosome characteristics. Since the production of triploid hybrids was not anticipated, the larval gonads were not examined when the preparations were made.

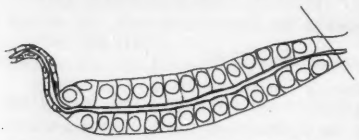


Fig. 1. Outline drawing of the thick basal portion of a normal, undistorted salivary gland of *Sciara*. This is the portion used for study. The gland is flat and consists of two rows of cells, separated by the duct

In the present paper frequent reference will have to be made to genetic and cytological processes which occur regularly and normally in species of *Sciara* but are very "unorthodox" as compared with those found in more "standard" organisms. For a general account of these the reader is referred to an earlier paper (METZ 1938b) which should be useful if present explanations are not clear.

It is a pleasure to thank Drs. WOLFGANG BEERMANN and HAMPTON L. CARSON for information and valuable suggestions in connection with the present work.

Material, methods, terminology, interpretations

Source of Material. Thus far in our studies on hybrids (including the present material), it has been possible to secure offspring only from *ocellaris* females by *reynoldsi* males, not from the reciprocal matings. In considering the present triploid material it is important, for reasons brought out later, to distinguish between the *ocellaris* mothers and to note their ancestry. This information and the source of the *reynoldsi* fathers is as follows: Specimen 5029 — the *ocellaris* mother was derived from a cross between two laboratory stocks of separate ancestry ("yellow unisexual" and "Hammonds"); the *reynoldsi* father came from "yellow" stock. Specimen 5030 — the same type of ancestry as 5029. Specimen 5031 — *ocellaris* mother came from a cross between laboratory stocks "Reeves-3" and "Hammonds"; *reynoldsi* father came from stock "379".

Methods. The preparations were made by the acetocarmine "squash" method in the usual manner. Each includes the pair of glands from one larva after removal of the long, narrow portion of the gland that is unsuitable for study. Since each gland is a flat organ, consisting of two single rows of cells separated by a common duct (see Fig. 1 and METZ 1935) it is well suited to present needs. All three triploid preparations are well stained, and number 5029, containing the mosaic gland, is unusually favorable for study.

Terminology. In deference to custom, the term "chromosome" is used here to apply without distinction to a single parental chromosome or to two homologous chromosomes intimately united side by side in somatic synapsis. In the triploids both conditions are found in the same nucleus; each *ocellaris* "chromosome" is

double, and loosely associated with it, but quite distinct in most cases, is the single homologous *reynoldsi* chromosome.

Interpretations. One question which arises in the present paper concerns the extent to which conditions in the developing eggs from the species cross differ from those in the pure species, and what interpretations are to be drawn therefrom. Earlier studies in our laboratory (METZ and LAWRENCE 1938 and unpublished data) have shown that among the hybrid flies are many which are developmentally abnormal, including a wide range of gynandromorphs. This contrasts strongly with conditions within the two species themselves, where such abnormalities are rare. Our cytological studies on the salivary glands and genetic studies on adults have been much more extensive within the two pure species (and also other species of *Sciara*) than in the hybrids, yet no triploid individuals have been detected in any pure species and no mosaic salivary glands such as those considered here. Occasional evidence of non-disjunction of individual chromosomes has been observed, comparable to that found in other organisms, but this process is not of concern in the present paper. As noted in a later section, selective elimination of paternal X chromosomes occurs as a normal developmental process in *Sciara*. This involves a delicately balanced reaction which may occasionally be disturbed in pure species material but is affected with a much higher frequency in the hybrids. It is presumably responsible for the "male-type" cells in some of the mosaic glands.

In view of the facts just enumerated it seems evident that although any of the aberrant phenomena dealt with here might rarely occur within pure species, their frequency is much greater in the hybrids and those included here are in all probability due to hybridity. Hence the interpretations set forth below are made on that assumption, even though to a great extent their significance is not dependent upon this aspect.

Conditions in the triploid glands

The basic chromosome group found in the somatic cells of both *ocellaris* and *reynoldsi* consists of three pairs of autosomes and a pair of X chromosomes in the female, and three pairs of autosomes plus a single X in the male. One autosome pair is long; the other two and the X are shorter. The same size distinctions apply in the salivary glands (METZ 1935, Frontispiece with insert); chromosome A is about twice as long as B, C, or X. Each is readily distinguished by its pattern of chromatic bands or disks. The respective homologs in the two species are readily identified by their band patterns, and in the hybrids by their synaptic associations as well. All these characteristics prevail, of course, in the triploid material under consideration here. Attention will be given first to the autosomes because the sex chromosomes exhibit additional features which require separate treatment.

The autosomes are triploid in all cells of all three specimens, including the mosaic gland. They consist of what appear at first to be three pairs of long, twisted chromosomes showing loose association and resembling superficially those seen in ordinary diploid hybrids (photomicrograph, Fig. 9, METZ and LAWRENCE 1938). But in each case one of the two members of the "pair" is much thicker than the other. This is the *ocellaris* component. Loosely associated with this, and united

in synapsis in some homologous regions, is the *reynoldsi* homolog from the father. The three single *reynoldsi* members present no peculiarities; they are what would be expected from the sperm in normal fertilization. In contrast, the *ocellaris* members are all double; they represent a double set (three pairs) showing intimate synapsis, and the evidence shows clearly that these are not simply sisters which have been derived by duplication of a single haploid set. That they are double is readily shown by the double structure observed in regions where twists occur, and in some cases by lack of synapsis of the two components in short regions. The latter reflect a third and conclusive feature, namely small structural differences between members of a pair, showing that the two cannot be true sisters.

In earlier papers we have shown that in this species, as in others of *Sciara* (see METZ 1941; also CARSON 1944; MCCARTHY 1945) small, inherited differences in banding pattern of homologous chromosomes are found in nature. Some of these are well known individually in our *ocellaris* stocks and have been shown in published photomicrographs, as indicated below. By chance, the *ocellaris* mothers of two of the triploids considered here (5029 and 5030) were evidently heterozygous for some of these minute band characters because the heterozygous condition is evident in the chromosomes under consideration. Four examples of such heterozygous loci are shown in the accompanying photomicrograph of End-2 of chromosome A, from specimen 5029 (Fig. 2). These are designated a, b, c and d. The terminal one (a) is apparently the same as that shown in figures 2—5 in METZ 1937; either b or c is shown in Figs. 13—15, METZ 1937; and d is shown in Fig. 6, D, METZ 1935 and Fig. 8, METZ 1938c. All these asymmetries are found consistently throughout the two glands. Similarly, specimen 5029 exhibits the heterozygous condition near end-1 of chromosome A shown in photomicrographs in Fig. 9, METZ 1937. It likewise exhibits the heterozygous condition near end-2 of chromosome C shown by ROHM (1947, Fig. 2, C) to be present in specimens derived from "Hammond's" stock, the stock from which one maternal grandparent of 5029 came. Specimen 5030 exhibits the heterozygous condition just noted near end-1 of chromosome A. Indications of comparable asymmetries have also been observed in chromosome B in these specimens, but they do not represent previously known cases and the evidence is not sufficiently clear-cut to justify final conclusions about them.

The foregoing evidence aids materially in trying to account for the double set of *ocellaris* chromosomes in the triploid cells and thus get an indication of the extent to which the foreign *reynoldsi* sperm can substitute for the *ocellaris* sperm in the *ocellaris* egg. In *Sciara*, the egg is fertilized as it leaves the oviduct in process of being laid (DU BOIS 1933).

At that time the chromosomes are normally in anaphase of the first meiotic division (SCHMUCK and METZ 1932; METZ and BOZEMAN 1942; CARSON 1946). Soon after laying, this division and the second are completed and the egg nucleus moves from the periphery to the center of the egg, where it joins the sperm nucleus (DU BOIS 1932; CARSON 1946).

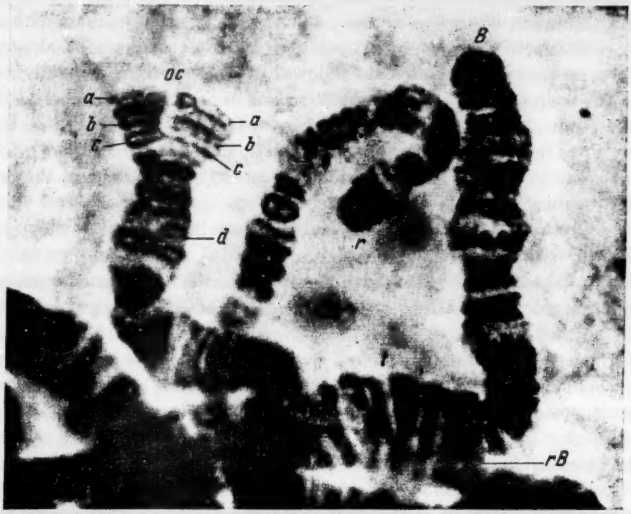


Fig. 2. Heterozygous loci in chromosome A of *S. ocellaris*. *oc* End-2 of *ocellaris* pair A showing asynapsis at tip. *a, b, c, d* Four heterozygous loci. Terminal capsule (*a*) in member at right is lacking or represented by *a* thin band in left homolog. Two capsules at b and c in left member are matched by a thin broken band and thin continuous band, respectively, in right homolog. Capsule at *d* on right side is lacking or represented by very thin band on left. This capsule appears to be somewhat smaller than it actually is, due to the low focus. Three of these loci (*a, d* and either *b* or *c*) have been found in comparable heterozygous condition in some pure *ocellaris* strains (see text). End-2 of the homologous *reynoldsi* chromosome A (single) is shown at *r*. *B* End-1 of *ocellaris* chromosome pair *B*. *rB* Corresponding single homolog of *reynoldsi* which is united in synapsis with its *ocellaris* mate in the region labeled *t*, producing a triple condition; at the right (*rB*) it turns down and is obscured by another chromosome. Slide 5029; triploid hybrid. Magnification × 3000

Since the double set of *ocellaris* chromosomes in the triploid cells did not arise through simple duplication of a haploid set in the egg nucleus after meiosis, the presumption is that it represents two of the four products of meiosis (egg nucleus and three polar bodies). This would seem to indicate that the stimuli provided by the *reynoldsi* sperm either were not suitable for bringing about normal completion of the meiotic divisions, or else they resulted in the union, after meiosis, of two of the four nuclei or chromosome groups just mentioned. Were

no other evidence available the former alternative would seem preferable because it is the simpler. But CARSON (1946) has described in *Sciara impatiens* a regular and normal fusion of two polar body nuclei to form a diploid nucleus. Such a diploid nucleus, if fertilized, would give rise to a triploid condition like that found in the present triploid hybrids. It seems probable, therefore, that the present specimens have resulted from the union of two polar body nuclei and a sperm nucleus without incorporation of the egg (oötid) nucleus at all. CARSON traces the history of the processes in *impatiens* as follows: At the second meiotic division the two spindles are at right angles to one another, one parallel to the surface, the other pointing toward the center. They are spaced so that tip "a" of one spindle lies close to tip "b" of the other. The two nuclei that come to lie at these tips (which are near the periphery of the egg) migrate together to the posterior end of the egg and fuse when about half way there. The third polar body nucleus likewise migrates to the posterior end. Meanwhile the definitive oötid nucleus moves to the center of the egg and unites with the sperm nucleus. The entire process is completed within about 120 min (at 21°C) after the egg is fertilized and laid.

If post-meiotic phenomena in *S. ocellaris* are like those in *S. impatiens*, as would seem probable, we may account for the diploid set of *ocellaris* chromosomes in the present triploid hybrids by assuming, as just indicated, that it came from the fusion nucleus ,not the oötid nucleus. The observed facts accord well with this view. The fusion nucleus would consist of one nucleus (or haploid chromosome set) from each of the two pairs of nuclei formed at the second meiotic division. This means that (except as modified by crossing over) it would contain pairs of homologs, not sisters, if the first meiotic division is reductional as appears to be the case in *Sciara* (SCHMUCK and METZ 1932; CARSON 1946).

On the interpretation just outlined it would be assumed that the interactions between the *reynoldsi* sperm and the *ocellaris* egg disturbed the meiotic or post-meiotic movements of polar body nuclei, or influenced migration of the sperm nucleus, in such a way as to bring about union of the latter with the diploid polar body (fusion) nucleus instead of the egg (oötid) nucleus. On the basis of the normal movements of nuclei in *S. impatiens* (CARSON *l. c.*) the movements in question would occur within about 50 to 75 minutes after fertilization, at 21°C. The corresponding stages in *S. ocellaris* have not been studied.

As to the probability of this interpretation being correct only a few comments need be made. 1. The interpretation accounts for the diploid *ocellaris* chromosome group in the triploid cells on the basis of observed, rather than purely hypothetical phenomena. 2. The phenomenon of polar body fusion may also be used to account for the diploid *ocellaris*

cells in a mosaic hybrid gland described previously (METZ 1942) as is indicated below. 3. On the other hand, one may argue that, since there are several possible ways of deriving double *ocellaris* chromosome sets in the hybrids, four cases out of the scores of specimens studied (probably at least 200) are insufficient to identify any one way as the actual one on the basis of present evidence. Likewise, it is possible that similar conditions may be brought about in different ways in different cases. Hence a brief outline of other possible interpretations is set forth below.

One possibility in any of the present cases is that in the egg the second meiotic division was inhibited, leaving a double set of *ocellaris* chromosomes in one or both of the second oöcyte nuclei, and that the sperm fused with such a nucleus. Another possibility is that the second division was completed but the two daughter nuclei from one division figure (either one) fused later and united with the sperm. These two procedures are alike, of course, in their end results; they differ merely in method or timing. In either case one product of the first meiotic division, consisting of four dyads (i.e., 4 pairs of chromatids) unites with the sperm. A third possibility is that meiosis was completed and the egg (oötid) nucleus subsequently joined one of the two nuclei derived from the first polar body, forming a fusion nucleus which united with the sperm. This last alternative is essentially like the initial interpretation in that it involves the union of haploid chromosome groups derived from the two second division figures, not from a single one.

More detailed analysis would be difficult at the present time because we lack evidence on two critical points, namely, which meiotic division is reductional here, and whether or not crossing over took place during meiosis in the eggs producing specimens 5029 and 5030. Since crossing over is known to occur in *Sciara* it could be invoked to account for the results on any of the above alternatives. It must be recognized, however, that in the case of specimen 5029 the amount of heterozygosity in the banding patterns of the double *ocellaris* chromosomes suggests strongly that basically the full diploid maternal set is represented here, whether or not some crossing over occurred. This, in turn, lends support to the view that if the first oöcyte division is reductional meiosis must have been completed and followed by union of the sperm with the equivalent of the fusion nucleus described by CARSON in *S. impatiens*. In the other cases the evidence is not sufficient to warrant such deductions. In any event, no matter which of the various interpretations is correct, it seems evident that an abnormal influence or response of the *reynoldsi* sperm is manifest at the outset of development in the present cases. This implies that a similar influence is exerted in all the hybrid fertilizations but that it is weak in nature, because in the vast majority of cases it is insufficient to bring about triploidy. As will be shown below, other

disturbances occur during the cleavage divisions or later, or both. There is, as yet, nothing to indicate the nature of the disturbing influences. So far as the *reynoldsi* sperm is concerned they may well be purely quantitative and reflect differences in the amounts of substances normally introduced by the *ocellaris* sperm.

In addition to the features brought out above there are three others which call for comment here, at least as a matter of record. These concern chromosome behavior in the triploid hybrids. In the two pure species the chromosomes exhibit a striking difference in behavior in salivary gland nuclei. In *reynoldsi* the chromosome ends show a strong tendency to adhere to one another and sometimes to interstitial regions, often making it difficult to identify the ends (METZ 1941; ROHM 1947). This seems to be caused by what appears to be terminal heterochromatin. In contrast, *ocellaris* chromosomes normally show almost no such tendency, or such terminal heterochromatin, except at end-1 of the X chromosome (METZ 1935). This distinction has been of special interest because of the very close relationship between the two species, and the question of where the terminal heterochromatin in *reynoldsi* came from and whether the "stickiness" is inherent in the material or depends on some specific genetic factor. In the diploid hybrids the presence of one set of *ocellaris* chromosomes apparently has no inhibiting influence on the tendency of the *reynoldsi* chromosomes to adhere to one another, and likewise the *reynoldsi* chromosomes do not change the behavior of the *ocellaris* chromosomes. The same seems to be true in the triploid hybrids. Although the relative "strength" of the stickiness tendency or degree of adhesion, is difficult to determine, the double set of *ocellaris* chromosomes apparently has no effect on it, which tends to indicate that it is inherent in the terminal material itself and not controlled by separate genetic factors.

Another distinction between the two species presents much the same problem. In *reynoldsi*, but not in *ocellaris*, *chromosome* C tends to separate into two approximately equal segments in the salivary glands (METZ and LAWRENCE 1938; METZ 1941; ROHM 1947; CROUSE 1947). Apparently the "break" always occurs at the same place. This characteristic is manifest in the diploid hybrids and also in the present triploid material, indicating again that the tendency is probably inherent in the material located at the spot in question.

The third aspect is that of somatic synapsis itself. Here, conditions in the two pure species are alike. But again we find that in the triploid hybrids each chromosome behaves as if uninfluenced by the triploid condition. The *ocellaris* homologs undergo intimate synapsis just as they would in an ordinary diploid female; and synapsis between these and the single *reynoldsi* homologs is loose and irregular as it is in the

diploid hybrids where only one of each is involved. This fact is interesting because our studies on the diploid hybrids have shown that the chromosomes are potentially capable of a much greater degree of synapsis than they usually manifest. Many regions which do not unite in any given cell will be found united in synapsis in other cells. Since in some other organisms degree of synapsis of all the chromosomes in a nucleus is known to be influenced by genetic factors, it would not have been surprising to find that either the *reynoldsi* chromosomes lessened synapsis between the *ocellaris* homologs or the double set of *ocellaris* chromosomes provided sufficient stimuli to induce closer synapsis between themselves and their *reynoldsi* counterparts. These observations apply to the X chromosomes as well as the autosomes.

The Sex Chromosomes

Since there are no Y chromosomes in known species of *Sciara* (review in METZ 1938b) we are concerned here only with the X. In the "female" specimen (5031) and in the "female" cells of the one containing the mosaic gland (5029), the appearance, number and behavior of the X's is like that of the autosomes so far as present features are concerned. The two *ocellaris* homologs are intimately united in synapsis and the *reynoldsi* X is loosely paired with them. All three members are stained similarly and the *reynoldsi* X is similar in diameter and staining qualities to the single *reynoldsi* autosomes in the same cells. In the "male" specimen (5030), however, and in the "male" cells of the mosaic gland (5029) the situation is strikingly different; there is only one X "chromosome" and it is very thick, pale and diffuse in appearance, with considerably greater diameter than the individual pairs of *ocellaris* autosomes (Fig. 3). It exhibits the peculiar characteristics that are typical of the unpaired X in an ordinary diploid male of *Sciara* (and some other Diptera). The evidence all indicates that it is the *pair* of *ocellaris* X's and that no *reynoldsi* X is present. That it is an *ocellaris* chromosome is indicated by its band pattern, and that it is double is indicated by its morphology. This is what would be expected. In *Sciara* the eggs which will develop into males regularly eliminate from prospective somatic nuclei the paternal X chromosomes (in this case *reynoldsi* X's). And since the *ocellaris* autosomes are double in the present case the X should be double also — as indicated especially by conditions in the mosaic gland (5029) where the few "male" cells are surrounded by 3X "female" cells in an apparently female individual (see below).

Assuming that the interpretation just outlined is correct, as seems to be required by the evidence, special interest attaches to the behavior of the pair of *ocellaris* X's in the absence of the *reynoldsi* X. In ordinary diploid flies of both species, and in the diploid hybrids, the characteris-

tics of the X just described depend upon the ratio of X chromosomes to autosome sets, following the "ratio theory" of BRIDGES (1939). In

Fig. 3. Photomicrograph showing the *ocellaris* X-chromosome (pair) and portions of the double *ocellaris* autosomes and single *reynoldsi* autosomes in a male-type (2X:3A) cell of the triploid hybrid mosaic specimen 5029. The paler color of the X is not revealed by the photograph, but the large size and other morphological characteristics are evident in comparison with the autosomes. The X is in the form of a Fig. 8 because of the normal "triple repeat" condition described in earlier papers (e.g., METZ and LAWRENCE 1938, Figs. 10, 13; METZ 1941). The photograph is taken at a low focus; actually both ends (1, 2) lie above the middle region. *a* Single *reynoldsi* autosomes. *B* End-2 of chromosome pair *B* of *ocellaris*. *C* End-2 of chromosome *C* pair, *ocellaris*, showing the two "bulbs", terminal and sub-terminal, separated by a narrow region. Magnification × 1750

females (2X:2A) the X's resemble the autosomes in size and other qualities; in males (1X:2A) the single X is large, pale, etc., in marked contrast to the autosomes. In the triploids under present consideration

the ratio of 3X:3A gives the typical female condition as would be expected on BRIDGES' theory, no matter whether we consider all three haploid sets of chromosomes together or treat the *ocellaris* members (2X:2A) and *reynoldsi* members (1X:1A) separately. In the "male-type" cells, however, we have a 2X:3A ratio, made up of 2X:2A *ocellaris* members and 0X:1A *reynoldsi* members. Three possible relationships exist. If *ocellaris* and *reynoldsi* chromosomes are equivalent in their influence the result depends on the total chromosome complement (2X:3A) and should represent an intersex condition (BRIDGES *l. c.*). But since the two X's present are both *ocellaris*, and the individual comes from an *ocellaris* egg, with *ocellaris* cytoplasm, the result might depend upon the *ocellaris* chromosomes alone (2X:2A), in which case the specimen should be of female type, which it obviously is not. Or, finally, the result might depend to a disproportionate extent upon the *reynoldsi* chromosomes, where the ratio is 0X:1A, a supermale condition which presumably could not exist independently in an entire organism. Whether the first or the last of these three alternatives is the more nearly correct, would be very difficult to determine by direct observation alone. But the main point seems clear, namely, that the *ocellaris* chromosomes do not determine the result independently, and that to a great extent the *reynoldsi* X and autosomes are functionally equivalent to their *ocellaris* counterparts, in their (indirect) influence on the *ocellaris* X's. And it is clear also that we are dealing here with interchromosomal activities within individual cells, not with intercellular phenomena, because the few male-type cells in the mosaic gland, even though surrounded by female-type (3X) cells, show what appears to be just as extreme a "male" condition as that found in the fully male individual (5030).

Although the peculiar characteristics of the single X chromosome in male salivary gland cells of Diptera have long been known, few attempts have been made to determine their significance so far as the writer is aware. It would be beyond the scope of the present paper to go deeply into this subject; but attention will be given briefly to some aspects upon which *Sciara* evidence has a bearing. The subject has been treated recently by ARONSON, RUDKIN and SCHULTZ (1954); by DOBZHANSKY (1957); and indirectly by RUDKIN (1955) and by RUDKIN and CORLETTE (1957). The first mentioned authors found that in spite of its greater diameter the male X, at the loci examined, gave the same ultraviolet absorbing results as a single member of the X pair in the female, and half that of the fused pair in the female. DOBZHANSKY (*l. c.*) has discussed the subject in connection with his observations on hybrids between *Drosophila insularis* and *D. tropicalis*. In males of such hybrids the large, pale X stands out conspicuously in contrast to

the single autosomes, which he finds completely unpaired although homologs are present. He calls attention to the resemblance between the condition of the entire X here and that of distended short regions known as "puffs", "bulbs", etc., in ordinary salivary gland chromosomes, both autosomes and X chromosomes. Earlier workers have interpreted the "puffs" and "bulbs", when in the "swollen" condition, as regions of high gene activity — an interpretation which DOBZHANSKY accepts and applies to the male X as a whole. He likewise considers the male X condition as functionally indicative of "dosage compensation" of the type postulated by MULLER (1950) on purely genetic grounds. As he points out, these views harmonize well with the cytochemical observations and deductions of ARONSON, RUDKIN and SCHULTZ, just mentioned. The latter aspect has been extended more recently by RUDKIN and CORLETTE (*l.c.*) using ultraviolet absorption. As is evident from the account in the preceding paragraphs, our observations on the X chromosome closely parallel, and lend support to, those of DOBZHANSKY; and they are subject to similar interpretation. In this connection attention may be given briefly to another matter, one which has not been treated previously so far as the present writer is aware. It concerns the broad question of whether genes in general function continuously or not. If we make the assumption that the swollen, pale condition of the "male X" is indicative of gene activity, all or most of the genes in this chromosome are presumably active all the time in the salivary glands, for the swollen condition is apparently characteristic of the chromosome at all stages after the glands become large enough to study. This would in turn strongly suggest that the genes are also continuously active in other tissues. But until we know whether the assumption just mentioned is correct or not it would be premature to draw any conclusions on these points. Much more work may well be required to determine the extent to which morphological characteristics of chromosomes can be used as criteria of gene activity.

The Mosaic Glands

The larva which produced the mosaic gland (slide 5029) is considered to be a female because all the cells in one gland and most of those in the other (the mosaic) have the "female-type" (3X:3A) chromosome group described above. Chromosome behavior in these cells is indistinguishable from that in specimen 5031, the fully triploid female. The remaining cells in the mosaic gland, however, have the "male-type" (2X:3A) chromosome group; and they exhibit the "male-type" X chromosome behavior like that in the triploid male specimen (5030) and like that in ordinary diploid males. The mosaic gland is especially favorable for study. With the exception of one cell too small for study and two cells

damaged in making the preparation, only three cells are questionable as to chromosome constitution among the 28 present in the portion of the gland preserved here. As indicated in Fig. 4, the row of cells on one side of the duct is distinct from that on the other. The cells having the complete triploid set of chromosomes are represented in outline; those lacking the paternal X are stippled. The "male-type" cells lie roughly in two groups, one toward the left end (3 cells) and one toward the right (6 cells). This distribution bears a striking resemblance to that described earlier (METZ 1942) in another mosaic gland and supports the inference drawn there that the gland is formed initially by differentiation of the cells which happen to lie in the proper region, regardless of their ancestry.

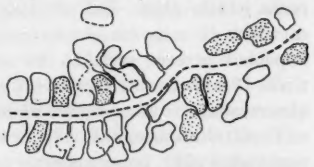


Fig. 4. Diagrammatic sketch of the mosaic triploid salivary gland in specimen 5029. Proximal end at left; distal end of the broad, preserved portion at right. Female-type (3X:3A) cells shown in outline; male-type (2X:3A) cells stippled. Of the four stippled cells below the duct, in the group at right, the two middle ones are definitely male-type; the other two are difficult to analyse and may possibly not be male-type. The long, broken line marks the course of the duct

In the present case both the modification which distinguishes the atypical cells, and the explanation for it, appear to be simple. In *Sciara*, as already noted, the paternal X is regularly eliminated during cleavage from prospective somatic cells in eggs which will develop into males. The present case may readily be explained, therefore, by assuming that the hybrid condition upset the elimination-determining balance sufficiently to cause the male type of elimination to occur in one or more mitotic figures, thus giving rise to the atypical cells. This view is supported by the fact that numerous gynandromorphs, with varying amounts of external male tissue, have been found in our diploid hybrid cultures. Polyspermy, as an explanation for the mosaic, seems out of the question here, for two reasons. First, no chromosomal sperm dimorphism is known in this material (see METZ 1938b); all the sperms here should have been alike. Second, fertilization in *Sciara*, so far as known, is regularly monospermic (SCHMUCK and METZ 1932). Whether the aberrant elimination process here occurred at the normal time, during cleavage, or at a later stage, and whether it occurred in more than one ancestral cell, is not clear from the evidence. But, two facts are significant in this connection. (1) Only one gland is mosaic, hence the atypical cells do not seem to be widely distributed in the embryo. (2) The atypical cells form two groups in the mosaic gland, indicating that they probably came from not more than two atypical cells a few cell generations earlier; and these two themselves may have descended from a single atypical ancestor. Concerning the organization of the gland two other points

may be noted. (1) Within each atypical group most of the cells are contiguous, indicating that relatively little cell movement occurred during the last two or three cell generations. (2) Each group includes, on opposite sides of the duct, cells which would be contiguous if not separated by the duct, thus indicating that the duct was not laid down until after cell multiplication and orientation were completed.

All four of these features agree with those found in our earlier mosaic study. In other respects, however, there are striking differences between the two cases, and the interpretation of either is influenced by phenomena in the other. The previous case (specimen 4573) involves a gland in which 16 cells are of the ordinary diploid hybrid type, as would be expected, and are just like the cells in the non-mosaic gland of the pair, while 12 cells are pure *ocellaris* (apparently diploid) without any paternal chromosomes. Among the 16 hybrid cells is one which has an extra *ocellaris* chromosome B. In interpreting this case previously it was postulated that, in an ancestor of the pure *ocellaris* cells, complete nondisjunction occurred causing all the *ocellaris* chromosomes to pass into one daughter cell and all the *reynoldsi* into the other, although no cells of the latter type were recovered. Other types of derivation were considered as possibilities only. On the basis of the evidence from the triploids described above it now seems more probable that the pure *ocellaris* cells were derived directly, without fertilization, from a polar body fusion nucleus (diploid) such as that described by CARSON (1946) in *S. impatiens*, and that only the ordinary hybrid cells came from union of the oötid nucleus with the sperm. In other words, on this view, the *ocellaris* cells were produced parthenogenetically and the hybrid cells biparentally. No heterozygosity in band pattern has been detected here to support this type of interpretation; but the derivation of the mother would not lead one to expect such a condition.

In this connection attention may be given briefly to two other hybrid mosaics, hitherto undescribed, from the same type of cross as the two already considered. These are both diploid. One (slide 5035) resembles the previously described mosaic (specimen 4573) in that some cells have a diploid set of chromosomes apparently all from one parent, instead of being hybrid in constitution. Two adjacent cells are thus distinguished. In these the thickness of the chromosomes indicates that they are double, while the band pattern and other characteristics indicate that they are from the *ocellaris* mother. Presumably the interpretation just outlined in the case of specimen 4573 applies equally well to this one.

The second undescribed case (slide 3645) is a sex chromosome mosaic in which most cells have the ordinary diploid group of a hybrid female. Three photomicrographs of chromosomes in one such cell of this specimen are reproduced in an earlier paper (METZ and LAWRENCE 1938, Figs.

9, 10 and 11A). But adjacent to this cell is a cluster of four "male-type" cells with a single X having the usual "male" characteristics of large size and pale color. Two other cells lying close together but distant from the four, have an X chromosome of this same type and appear to be like the four, although in these the chromosomes are entangled and it is difficult to make sure that only one X is present. In spite of the fact that the preparation as a whole is well stained and favorable for study, the single X in the six cells here is so pale, and the band pattern so indistinct, as to prevent determining whether it is from the mother *(ocellaris)* as would be expected. The origin of the aberration, however, is readily accounted for by assuming, as in the case of the triploid specimen 5029, that in one or more cleavage mitoses the male-producing type of sex chromosome elimination occurred. With respect to topography or cell relationships the present case apparently resembles the diploid mosaic 4573 and the triploid mosaic 5029. The "male-type" cells form a cluster of four in one region. The other two similar cells were probably not associated with the cluster in the intact gland. But their exact original location cannot be determined because in making the "squash" preparation the glands were ruptured, freeing and intermingling some of the cells.

Discussion

Because topics of different kinds are included in the present paper, most of the discussion has been presented under the respective headings above and only a few items call for treatment here.

One concerns the peculiarities of the X chromosome in the salivary glands when the ratio of X chromosomes to sets of autosomes is less than 1:1. Apparently there is an essentially uniform response of the entire chromosome with respect to factors which determine its diameter, its density of staining and its internal structural appearance as seen under the microscope in fixed preparations. This seems to indicate that the entire chromosome, throughout its length, responds as a unit or else that all regions along its length respond similarly. The latter alternative seems the more probable and would be expected on the basis of MULLER'S dosage compensation hypothesis, cited by DOBZHANSKY, as well as on the basis of the cytochemical evidence that in the salivary glands the X of the male contains only half the amount of DNA found in the X pair of the female. If we adopt this general view the question arises as to whether we may generalize further and use the morphological features characterizing the "male-type" X as indicative of excess gene activity wherever they may be found. Some significant evidence on this aspect is provided by the observations of FUJII (1940) on the sixth chromosome in the salivary glands of the New Orleans strain of *Drosophila virilis*.

This chromosome is an autosome which regularly exhibits in the diploid cells the morphological features characteristic of the unpaired X in males (considered above) — paleness, greater thickness and more granular rather than relatively solid cross bands. FUJII's evidence, including photomicrographs, shows that in crosses with other strains of the species this sixth chromosome retains its characteristics undiminished, in contrast to its mate from the other strain. And even more significantly, the evidence shows that following crossing over the segments of this chromosome likewise retain the characteristics even though intimate synapsis, band by band, occurs in the pairs. It appears, therefore, that the characteristics do not depend in this case on the chromosome ratio. Two sixth chromosomes are present in all cases. We are dealing with a genetic character showing ordinary inheritance, as FUJII points out. And apparently all parts of the chromosome are self determining, as indicated by the crossover results. Were it not for these latter results, in which part of a New Orleans chromosome is combined with part of a "normal" chromosome, we might postulate that the New Orleans sixth chromosome possesses only half the number of chromonemata, which therefore have to "work harder" than those of other chromosomes. But this would require that in the crossover cases part of a chromosome has twice as many sets of genes as the remainder. And since the trait is inherited, it would seem necessary to assume that this ratio applies in ordinary mitotic cells as well as in the salivary glands, which appears to rule it out unless it can be supported by direct morphological or biochemical evidence. These considerations also have a bearing on the interpretation of the "puffs" and "bulbs" in the salivary gland chromosomes, but no attempt will be made to go into that aspect here.

Our earlier studies (METZ and LAWRENCE 1938) have shown that numerous developmental disturbances, including aberrant chromosome behavior in mitosis, occur in the *ocellaris* eggs fertilized by *reynoldsi* sperm. These are revealed especially by gynandromorphs of various kinds in which the amounts and the distribution of male and female tissues presumably reflect the types of X chromosome elimination which occurred and the times and locations at which they occurred. The present paper adds two significant features to this picture: (1) it indicates that the initial influences or reactions of the *reynoldsi* sperm are sufficiently different from those of *ocellaris* to induce abnormalities in the meiotic divisions of the egg or in the immediately following nuclear behavior, or both, including fertilization phenomena (union of pronuclei). (2) It indicates that some gynandromorphs may owe their origin to aberrant fertilization phenomena of this kind, rather than to abnormal types of X chromosome elimination during cleavage or later as formerly assumed. For example, in a gynandromorph, one cell line (presumably

the female-producing line) might arise from a polar body fusion nucleus of the type considered above, while the other line arose from fusion of the sperm nucleus with a third polar body nucleus or the oocyte nucleus itself. In each of the two lines the expected type of X chromosome behavior should occur. Having no paternal chromosomes, and only two X's, the descendants of the fusion nucleus would not eliminate any chromosomes and would give rise parthenogenetically to female tissue. Descendants of the fertilization nucleus, however, would undergo the male type of X chromosome elimination if the mother were a male producer. On the other hand, if the mother were a female producer, a female should result, consisting of two types of tissue, part pure *ocellaris* and part hybrid, which is the condition found in the mosaic hybrid described previously (METZ 1942).

Although they may lead to striking results, the differences between the *reynoldsi* sperm and the *ocellaris* sperm reflected in the early disturbances considered above are probably slight. Fusion of polar body nuclei as a normal and regular process is known to occur in such widely separated groups of Diptera as *Sciara* (CARSON 1946) and *Drosophila* (see CARSON, WHEELER and HEED 1957, for review) and therefore is probably common in this order. And comparable phenomena appear to occur in other orders of insects (see, e.g., TUCKER 1958). Furthermore, natural parthenogenetic development from such fusion nuclei has been shown to occur in *Drosophila parthenogenetica* and probably in *Lonchoptera dubia* (STALKER 1954, 1956), and likewise in *Drosophila mangabeirai* MALOGOLOWKIN (MURDY and CARSON 1959). It is significant that in *D. parthenogenetica* a good many eggs begin development, but turn brown and die during the early larval stages. Miss LE ETTA SANGER, working with CARSON and STALKER, has found that in most of these, at least, nuclear fusions of irregular types occur, giving various mosaic combinations, such as n-2n; n-3n; n-2n-3n, with lethal effect. She has also found that among the individuals that develop from normal colored eggs are triploids as well as diploids[1].

In view of the fact that natural parthenogenetic development involving nuclear fusion is so widespread we may reasonably infer that the disturbances in nuclear behavior in the present hybrid material, are not radical in nature. Similarly, the other aberrant phenomena found in the mosaics, such as loss of the paternal X chromosome, represent relatively mild disturbances. The evidence agrees with that from our earlier work on the hybrids in indicating that the two parental species are separated genetically, as well as in chromosome band pattern, by many small differences. Thus far no radical difference has been identified; but that fact may be due to lack of evidence as to what

[1] Miss SANGER has kindly permitted citation of her unpublished results here.

is responsible for the two major phenomena, hybrid sterility and failure of *reynoldsi* females to cross with *ocellaris* males.

Although somewhat outside the scope of the present paper, the question of the sex of the three triploid individuals treated here calls for brief comment, especially the specimen (5030) which is considered to be a male on the basis of its sex chromosome behavior and constitution (XXO). In his studies on *Chironomus* species hybrids, BEERMANN (1953, and personal communication) has found triploid females with three sex chromosomes, apparently XXY, in the salivary glands. This might suggest that specimen 5030 actually represents a female in spite of its male type of sex chromosome behavior. Unfortunately, direct evidence is needed to answer the question because the genetic mechanisms of sex determination in the two cases appear to be radically different. As indicated above, such evidence is not available at present.

Summary

A study of the salivary glands of triploid hybrids between females of *Sciara ocellaris* and males of *Sciara reynoldsi* throws light on several problems concerning chromosome behavior, species relationships and embryonic development. The specimens studied possess two sets of *ocellaris* chromosomes and one set of *reynoldsi* chromosomes. Three types of conditions are represented; 2X:3A; 3X:3A; and a mosaic possessing cells of both kinds.

Heterozygosity of chromosome band pattern in the hybrids shows that the *ocellaris* homologs are not true sisters and that the sperm probably united with a diploid fusion nucleus composed of two polar bodies and not with the oötid nucleus. This indicates strongly that in a previously described diploid hybrid mosaic some cells developed parthenogenetically from such a fusion nucleus, while others were biparental in origin. The evidence supports the view that the initial influences or reactions of the foreign *reynoldsi* sperm differ from those of the *ocellaris* sperm immediately after entry into the egg, but that then and later the differences are relatively slight, although numerous. This agrees with our earlier evidence from the hybrids in indicating that the two parental species are separated genetically, as well as in chromosome band pattern, by many small differences.

Species-specific characteristics of chromosome behavior are described which retain their specificity in the hybrids.

The 2X:3A cells lack a *reynoldsi* X. The double *ocellaris* X in such cells (including those in the mosaic) exhibits the peculiar features manifest by the single X in ordinary diploid XO males in the pure species (and in many other Diptera). It is pale and diffuse in structural appearance, and throughout its entire length is uniformly much greater in diameter

than it is in the 3X:3A cells. The possible significance of this behavior is discussed in relation to problems of sex determination (e. g., BRIDGES' "ratio theory") and those concerning time of gene action. The structural resemblance to the "puffs" and "bulbs" found in salivary gland chromosomes is striking and raises the question as to how far morphological characteristics of chromosomes can be used as criteria of gene activity. The double X in the 2X cells of the mosaic, surrounded by 3X cells, exhibits the same peculiarities as those in a pure 2X:3A „male-type" specimen, indicating that we are dealing with intracellular, not intercellular phenomena.

Conditions in the mosaic gland support the evidence from the diploid hybrids (some described here for the first time) in indicating that the salivary gland is formed by differentiation of cells which happen to lie in the proper region, regardless of their ancestry. The triploid mosaic specimen (and also a diploid mosaic) is presumed to be a female in which the normal male-producing type of chromosome elimination occurred in one or more mitotic divisions during cleavage or later.

Literature

ARONSON, J. F., G. T. RUDKIN and J. SCHULTZ: A comparison of giant X-chromosomes in male and female *Drosophila melonogaster* by cytophotometry in the ultraviolet. J. Histochem. Cytochem. **2**, 458—459 (1954).

BEERMANN, W.: Chromosomenpolymorphismus und Bastardierung zweier *Chironomus*-Arten. Verh. Dtsch. Zool. Ges. Freiburg. Zool. Anz. Suppl. **17**, 290—295 (1953).

BRIDGES, C. B.: Cytological and genetic basis of sex. Cp. II in: Sex and Internal Secretions. Baltimore: Williams & Wilkins Company 1939.

DU BOIS, A. M.: A contribution to the embryology of *Sciara (Diptera)*. J. Morph. **54**, 161—195 (1932). — Chromosome behavior during cleavage in the eggs of *Sciara coprophila (Diptera)* in the relation to the problem of sex determination, Z. Zellforsch. **19**, 595—614 (1933).

CARSON, H. L.: An analysis of natural chromosome variability in *Sciara impatiens* JOHANNSEN. J. Morph. **75**, 11—59 (1944). — The selective elimination of inversion dicentric chromatids during meiosis in the eggs of *Sciara impatiens*. Genetics **31**, 95—113 (1946).

—, M. R. WHEELER and W. B. HEED: A parthenogenetic strain of *Drosophila mangabeirai* MALOGOLOWKIN. Genetics of Drosophila IX, University of Texas Publ. No **5721**, pp. 115—122, 1957.

CROUSE, H. V.: Chromosome evolution in *Sciara*. J. Hered. **38**, No 9 (1947).

DOBZHANSKY, T.: The X-chromosome in the larval salivary glands of hybrids, *Drosophila insularis* × *Drosophila tropicalis*. Chromosoma (Berl.) **8**, 691—698 (1957).

FUJII, S.: An abnormal staining capacity of the sixth salivary gland chromosome of a strain of *Drosophila virilis*. Cytologia (Tokyo) **10**, 294—301 (1940).

MCCARTHY, M. D.: Chromosome studies on eight species of *Sciara (Diptera)* with special reference to chromosome changes of evolutionary significance. I. and II. I. Amer. Naturalist **79**, 104—121; II. Amer. Naturalist **79**, 228—245 (1945).

METZ, C. W.: Structure of the salivary gland chromosomes in *Sciara*. J. Hered. **26**, 177—188 (1935). — Small deficiencies and the problem of genetic units in the giant chromosomes. Genetics **22**, 543—556 (1937). — *Sciara reynoldsi*. J. Hered. **29**, 176—178 (1938a). — Chromosome behavior, inheritance and sex determination in *Sciara*. Amer. Naturalist **72**, 485—520 (1938b). — Observations on evolutionary changes in the chromosomes of *Sciara (Diptera)*. Cooperation in Research — Publication Carnegie Institution, Washington, No **501**, pp. 275—294, 1938c. — Species hybrids, evolutionary chromosome changes, and the mechanism of chromosome rearrangement in *Sciara*. Proc. 7th Internat. Genetics Congress. J. Genet., Suppl., 215—218 (1941). — Mosaic salivary glands in *Sciara*. Amer. Naturalist **76**, 623—630 (1942).

—, and M. L. BOZEMAN: Chromosome studies on *Sciara*. Carnegie Instn. Publ. No **41**, 237—242, 1941/42.

—, and E. G. LAWRENCE: Preliminary observations on *Sciara* hybrids. J. Hered. **29**, 179—186 (1938).

MULLER, H. J.: Evidence of the precision of genetic adaptation. Harvey Lect. **43**, 165—229 (1950).

MURDY, W. H., and H. L. CARSON: Parthenogenesis in *Drosophila mangabeirai*. Amer. Naturalist 1959 (in press).

ROHM, P.: A study of evolutionary chromosome changes in *Sciara (Diptera)*. Chromosome "C" in the salivary gland cells of *Sciara ocellaris* and *Sciara reynoldsi*. Amer. Naturalist **81**, 5—28 (1947).

RUDKIN, G. T.: The ultraviolet absorption of puffed and unpuffed regions in the salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Genetics **40**, 593 (1955).

—, and S. L. CORLETTE: Disproportionate synthesis of DNA in a polytene chromosome region. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **43**, 964—968 (1957).

SCHMUCK, M. L., and C. W. METZ: The maturation divisions and fertilization in eggs of *Sciara coprophila*: Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **18**, 349—352 (1932).

STALKER, H. D.: Parthenogenesis in *Drosophila*. Genetics **39**, 4—34 (1954). — On the evolution of parthenogenesis in *Lonchoptera (Diptera)*. Evolution **10**, 345—359 (1956).

TUCKER, K. W.: Automictic parthenogenesis in the honey bee. Genetics **43**, 299 to 316 (1958).

Prof. Dr. C. W. METZ
Marine Biological Laboratory
Woods Hole, Mass. USA

Chromosoma (Berl.) 10, 535—588 (1959)

From the Department of Biology, University of Florida, Gainesville, Florida

CYTOGENETIC ANALYSIS OF MAJOR HETEROCHROMATIC ELEMENTS (ESPECIALLY Xh AND Y) IN DROSOPHILA MELANOGASTER, AND THE THEORY OF "HETEROCHROMATIN"*

By

KENNETH W. COOPER

With 56 Figures in the Text

(Eingegangen am 30. Mai 1959)

Contents

page

Introduction 535
Structure and Cytologic Map of the Sex Chromosomes 539
Dimensions 539
The X Chromosome 540
The Y Chromosome 542
The Cytogenetic Structure of Xh and Y 545
The Location of Bobbed 545
The Fertility Complexes 551
Other Factors in Y 551
The Probable Sites of Exchange 552
The Blocks 556
A Cytogenetic Map of the Heterochromatic Region of X 562
The Cytogenetic Attributes of the Major Heterochromatic Regions 564
"Permanent" Heteropycnosis 565
Genetic Activity, Absolute and Relative 566
An Interpretation of the Cytological Organization of the Major Heterochromatic Regions 571
Chromosomal Differentiation 575
Summary and Conclusions 579
Literature Cited 580

Introduction

Considering the diversity of behavior and actions of chromosomes, whether viewed comparatively among organisms or among cell types within a kind of organism, it is a remarkable fact that chromosomes everywhere seem to be constructed on a common plan, and that this common plan includes so very few discrete organelles or specializations visible to the microscopist. Thus, aside from chromonemata, perhaps some classes of "chromomeres", and possibly matrix and pellicle, the cytologist knows only the kinetochore, the nucleolus organizer, com-

* This investigation was supported in part by a grant (G-419) from the National Science Foundation to the University of Rochester. The actual research was completed in the Department of Biology at the University of Florida.

missures or constrictions of unguessed function, and so-called "euchromatic" and "heterochromatic" parts. Of the organelles and specializations, only a kinetochore is common to all chromosomes, or nearly all. As a genetic contrivance or mechanism, then, the chromosome seems to have few first order parts, and most of its intrinsic behavior would seem to require explanations at a second, or molecular, level of organization. For these reasons most investigators look to kinds of "chromatin" and their interactions for solutions of chromosomal behavior, and the discovery today of still other chromosomal organelles would come to most as a major surprise.

Perhaps the chief puzzle presented the cytogeneticist by the visible organization of chromosomes is that arising from the seeming dualism and very evident contrast between parts of chromosomes, or between chromosomes, that are in advance of or behind the remainder in their condensation at any stage, and especially during interphase and prophase. Although such chromosomes or parts are conveniently termed "heteropycnotic" or, less accurately, "heterochromatic", they are unfortunately often spoken of as though composed of a "heterochromatin", a fancied substance or class of substances held to be akin to, but consistently different from, a so-called "euchromatin" of the remainder or *isopycnotic* elements as ÖSTERGREN (1950) aptly terms them. Yet it is a sobering thought that the cytological recognition of a heterochromatic element depends solely upon its *out-of-phaseness* or discordance, that is, its *heteropycnosis*; the comparative cytologist cannot meaningfully speak of either heterochromatic or euchromatic elements in an undifferentiated nuclear set, for of course such a set would necessarily be described as isopycnotic.

Further, as is well known, chromosomes and chromosomal regions that are heteropycnotic at one stage, or in one kind of cell, or in one sex, are in many instances not so at another stage, or in a particular cell, or in the other sex. Indeed it is not possible today to say of any isopycnotic region that it is not heteropycnotic (hence "heterochromatic") at some time or other, nor of any heterochromatic region that it is always heteropycnotic (that is, never "euchromatic"). In fact our leading hypotheses have not been of a sort that would foster inquiries into these matters, and we very likely delude ourselves in the hypostasizations "heterochromatin" and "euchromatin" (*cf.*, BAKER and CALLAN 1950).

Nevertheless the fact of heteropycnosis is beyond dispute, and heteropycnotic regions and chromosomes are in themselves of exceptional interest. In many cases their easy recognition makes it possible to follow cytologically their activities and relations at times when all else of a nuclear complement is unrecognizable, or of a sameness, and some of the better known cycles and activities of heteropycnotic elements are

not paralleled by any known isopycnotic member (*v.* WHITE 1954; GOLDSCHMIDT 1955). Studies of heterochromatic elements have suggested to one or another that "heterochromatin" possesses a remarkable and even inconsistent galaxy of attributes (reviews in: SCHULTZ 1941, 1944, 1948, 1952; PONTECORVO 1944; RESENDE 1945; DARLINGTON 1947; VANDERLYN 1949; GOLDSCHMIDT 1949, 1955; BARIGOZZI 1950; HANNAH 1951; SHARMA and SHARMA 1958). For example, it has been suggested that *heterochromatin*, even though largely inert genetically, nevertheless acts (1) *on genes* to control mutation, to modify specific gene action, penetrance, and specificity, and to quantitatively affect the action of some or all genes; (2) *within chromosomes* to stabilize kinetochores and chromosomal ends, to affect breakability and rejoinability, to bring about or prevent pairing of homologs at meiosis, to regulate crossing over and chiasma localization, to produce specific, nonspecific, and reversed pairing and conjunctive properties, and to cause variegation and chromosomal "stickiness"; (3) *transchromosomally* by controlling the dimensions of all chromosomes of a nucleus, by regulating crossing over, pairing, and disjunction of other chromosomes, and by controlling variegation brought about by genes located in other chromosomes; (4) *metabolically* by performing or mediating special syntheses of nucleic acids, proteins, nucleolar material, "cytoplasm", and energy-rich substances, and by controlling the transfer of substances across the nuclear membrane; (5) *on the cell* by playing a significant role in the control of cell size and by governing mitosis; (6) *on development* by regulating rates of growth and differentiation, by regulating the very nature of differentiation itself, and perhaps also by playing a role in sex determination; (7) *in speciation* by providing neutral (or genetically inert) anchorage and supplementary chromosomal parts for rearrangements, translocations, and increases in chromosomal arm numbers, no less also duplicate genes that may acquire new functions; and, finally, (8) *in theory* as the especial "seat of the unorthodox" in genetic systems. And so on.

Now there is little doubt that a number of these actions has been shown or made probable as properties somehow associated with one or another heterochromatic element, and geneticists such as MULLER, SCHULTZ, PONTECORVO, MATHER, and DARLINGTON would view at least some of the actions as consequences of genes (perhaps of a distinctive sort) lying in the heteropycnotic regions. But, probably as an outcome of the use of the word "heterochromatin", these (and still other) special activities are quite commonly thought to be expressions of a system that is defined as little differentiated, a material—as it were—endowed with a manifold of important attributes. One consequence of this view has been that heterochromatic elements or regions are commonly treated as stuffs and, to test the effects of "heterochromatin", duplications,

Y-chromosomes, and B-chromosomes have been added to or subtracted from nuclear complements. The conclusions drawn are then related not to a possible genetic order or diversity within the structure of these elements, but rather to the "heterochromatin" of which they are assumed to be composed. The notions concerning "heterochromatin" have thereby become a complex and inconsistent paragenetic system, and most hypotheses importantly involving "heterochromatin" are now ordinarily elusory and beyond proof or disproof.

Genetics has progressed furthest where its systems have been dealt with as though resolvable into sequential components, and in general where this has been done a good one-to-one correspondence has been found between resolved elements and functions. Aside from major heterochromatic regions, the geneticist has nowhere found it necessary to accept a many-to-one relation, no less the notion of a scantly differentiated, partially or wholly dispensible system that nevertheless paradoxically possesses generalized activities having such far-reaching consequences. The time thus seems due that a start should be made to discover whether heterochromatic regions are in fact versatile and little-differentiated, as so widely believed today, or are often versatile yet composed of parts which may stand on the whole in a one-to-one relation to the manifold of properties.

In this and a succeeding paper, I shall try to show some consequences of such a partial analysis of the major heterochromatic elements of the X chromosome and of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. It is assumed that a successful reduction of the heterochromatic right half of X (or "Xh" in abbreviated distinction from "Xe", the euchromatic remainder) to specific components with special functions would do much to dispel the need for the idea of a "heterochromatin", in this case at least. This first article will draw attention to the cytologic structure of the heterochromatic proximal half of the X chromosome, and of Y, reanalyse the cytogenetic information on their genetic composition and exchange points, critically evaluate the maximum sizes of blocks A and B, and provide a tentative map of known parts and breakpoints in Xh. Finally, it will be shown that heterochromatic and euchromatic regions of chromosomes can be and perhaps generally are of the same basic genetic and cytologic chromonematal structure, and that at least some of the cytogenetic properties of Xh and Y, hence of their "heterochromatin", may be viewed consistently as reflections of temporary states of the chromonematal region concerned, perhaps with unusually long temporal periods, rather than as prime examples of a fundamentally distinct form of chromosomal constitution.

This paper is dedicated with admiration and affection to Professors SALLY HUGHES-SCHRADER and FRANZ SCHRADER, now newly emeritus, whose wondrous

and fruitful research and instruction, and infectious enjoyment of cytology and living things, have sharpened the eyes and minds of nearly two generations of younger biologists among whom I enjoy the good fortune to be one.

Structure and Cytologic Map of the Sex Chromosomes

Although it is true that most of the special segments and constrictions in the sex chromosomes of *Drosophila melanogaster* ordinarily are not to be seen at either mitotic or meiotic metaphase, they nevertheless give prophasic chromosomes that are fixed in acetic acid and stained with aceto-orcein or carmine a mapable morphology to which loci of meiotic conjunction, genetic properties, and the breakpoints of rearrangements may ultimately be referred. Oddly enough, as will be described elsewhere, these elements are often much more easily demonstrated in free duplications and attached fragments than in the original intact chromosome.

Dimensions

Neither the rod-like (akrokinetic) X-chromosome nor the heterobrachial (metakinetic) Y-chromosome is of constant size, both chromosomes varying considerably in their pro-, meta- and anaphasic dimensions in different types of cells, and even among different cells of a type. Thus in large and small neuroblasts, and in large late larval or early pupal spermatocytes as compared with the smaller cells in the adult, as examples, the larger cells have more or less proportionately larger chromosomes. What is more, the size of a chromosome in a cytologic preparation is of course also a function of the method of fixation and subsequent treatment. To judge from earlier observations of fixation changes in chromosome and sperm head volumes (Cooper 1949, 1950), the acetic acid-fixed chromosomes on which this study is based are swollen in volume perhaps four to eight fold their dimensions in life; that is, linear dimensions are probably increased from about 1.5 to 2 times those in the living cell.

In my preparations of large neuroblasts, the X chromosome at metaphase ranged from three to more than five microns in length; at first metaphase of meiosis it measured from somewhat less than two to slightly greater than four microns, with a mean length of 2.9 microns. In both ganglia and first spermatocytes the average girth of the metaphase X, measured across the two appressed chromatids, lay between 0.3 and 0.4 microns.

As Bridges (1916, 1927), and Stern (1927) found, the short arm of the Y chromosome (Y^S) ranges from approximately half to two-thirds that of the long arm (Y^L). The Y chromosome, in the nearly cylindrical long arm at least, is similar in girth to the X of its set. If allowance is

made for the tendency of the short arm to stretch in its proximal region, the length of the condensed Y ranges from approximately 1.7 microns in smaller cells to somewhat over 4.5 microns in the largest neuroblasts and spermatocytes I have studied. The average length at first metaphase of meiosis is somewhat less than that of X, being about 2.3 microns, although not every Y chromosome was shorter than the X with which it was paired.

The X Chromosome

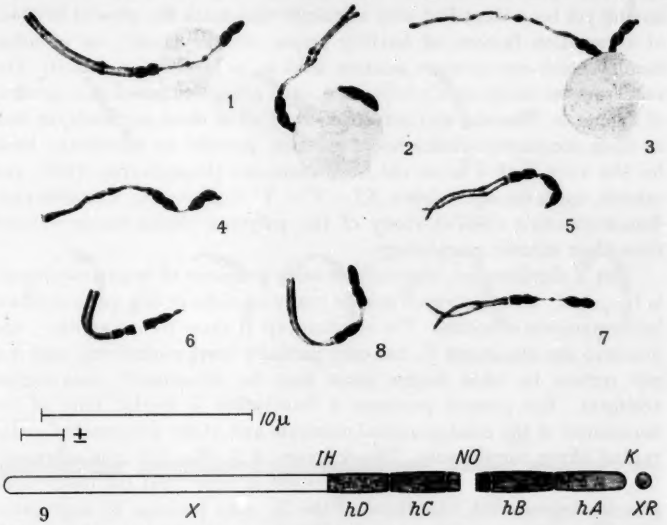
Approximately the proximal half of the X chromosome (Figs. 1—9) is heteropycnotic (HEITZ 1934; KAUFMANN 1934; and others). The isopycnotic-heteropycnotic junction (IH) is striking in early and mid prophase, and ordinarily may be recognized in the late prophasic and fully condensed X because the separation of chromatids, which may be marked distally, customarily is not evident from this point proximally to the kinetochore. This is also a point at which the X tends to bend, and has been described by KAUFMANN (1934) as a constriction.

The kinetochore (K) of the X chromosome is subterminal (Figs. 1—6, 9), cutting off a small right limb, XR (KAUFMANN 1933, 1934; PROKOFYEVA 1935; and others). Slightly more than half-way between the kinetochore and the isopycnotic-heteropycnotic junction, in about the proximal third or fourth of the X, there is a prominent constriction (BRIDGES 1927; DOBZHANSKY 1932a, b; HEITZ 1933, 1934; and others) which frequently appears as a clear, non-staining gap across the chromosome (NO). KAUFMANN (1933, 1934) and HEITZ (1933) proved this constriction, the most striking and easily demonstrated landmark in the X-chromosome, to be a nucleolus organizer as shown in Figs. 1—3, 9.

The more proximal heteropycnotic region lying between the kinetochore and the nucleolus organizer, and the more distal lying between the nucleolus organizer and the isopycnotic-heteropycnotic junction, are in turn divided by one secondary constriction each (Figs. 1—9). The four large heterochromatic elements thus set apart will be designated, from genetic right to left, as "hA", "hB", etc. (Fig. 9), "h" denoting that they are located in the heterochromatic half of X (Xh) and preventing their confusion with blocks A and B of Muller and co-workers (MULLER, RAFFEL, GERSHENSON, and PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1937; GERSHENSON 1940; RAFFEL and MULLER 1940). As will be shown further on (pp. 545), and discussed at greater length elsewhere, the bobbed locus in X lies close to the nucleolus organizer (COOPER 1958), probably in hB, and indeed quite likely near the mid-point of hB.

The parts hA to hD do not seem to have been explicitly described by others. Nevertheless they have evidently been seen by KAUFMANN,

hA to hD being clearly delineated in both X-chromosomes of Fig. 5 of his valuable account of the somatic chromosomes of *Drosophila melanogaster* (KAUFMANN 1934). Though constrictions hA/hB, hC/hD and hD/IH more often than not fail to appear as complete divisions across the chromosomes, there are instances in which they certainly do (Figs. 1—8). Less clear, however, is the significance of faint tertiary constrictions, perhaps truly indentures in KAUFMANN's (1934) sense, which are sometimes seen and suggest a division in one or another of the h-elements.



Figs. 1—9. Differentiation of the heteropycnotic right half (≈ *Xh* + *XR*) of the X chromosome of *Drosophila melanogaster* in early (1—3), mid (4, 5, 7, 8), and late prophases (6) of neuroblasts. Figs. 1, 4 of a y^2 apr v, X^+; 2, 3 of Swedish-b, X^+; 5—8 of Canton-S, X^+. Fig. 9, diagrammatic representation of *X*, heteropycnotic regions in grey: *IH*, junction of isopycnotic and heteropycnotic regions; *hA*—*hD*, main segments of Xh with the "paranucleolar bodies" set off to each side of the nucleolus organizer; *K*, kinetochore; *NO*, nucleolus organizer; *XR*, genetic right limb of X

For example, Fig. 8 shows an instance of such an indenture in hB, but the indications are always slight and difficult to evaluate. Little can be said concerning these possible finer discontinuities in the heterochromatic region of X except that each h-element has been seen to be so indented. Since the indentations may be especially well-marked in free duplications, it is unlikely that they are simply the result of relational coiling. Finally, there may be seen an indenture, or even a sharp separation, of the regions of hB and hC immediately adjacent to the nucleolus organizer by which a pair of "paranucleolar bodies" (perhaps

identical with the elements sometimes seen as though embedded within the nucleolus) are set apart (*cf.* Figs. 2—4, 9 and 1). It is very likely, therefore, that each of the denoted elements hA—hD are composite entities rather than cytologically indivisible blocks.

The Y Chromosome

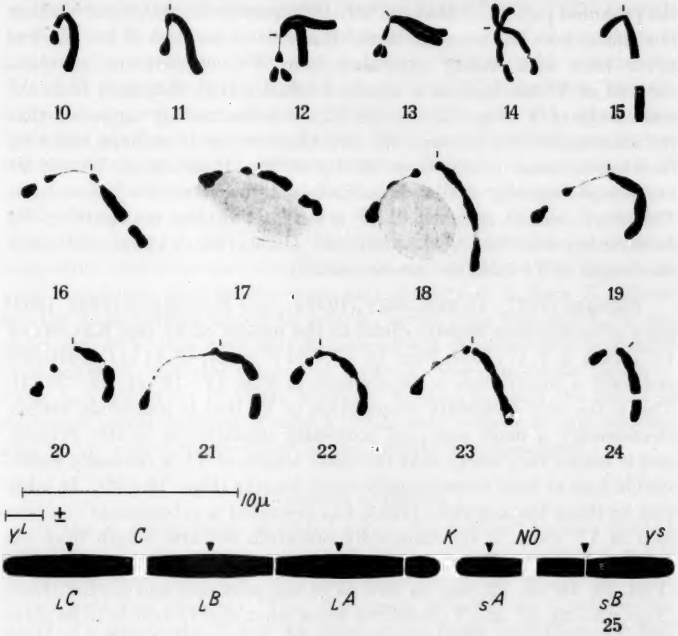
So far as can be told, the mitotic Y-chromosome is totally heterochromatic (HEITZ 1933), no euchromatic lengths within either arm having yet been identified with certainty that mark the sites of bobbed, of variegation factors, of fertility genes, of "polygenes", or of other factors which one or more workers hold to be localized within it. The two arms are distinctively organized, each being composed of a number of segments. The size and arrangement of all of these segments, as well as their conjunctive behavior at meiosis, provide no significant basis for the view that Y is an old isochromosome (DARLINGTON 1940; and others), nor is the equivalence $XI \equiv Y^S \equiv Y^L$ suggested by PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA's (1937a) study of the polytene chromosomes evident from their mitotic morphology.

The Y chromosome, especially in early prophase of large neuroblasts, is frequently seen disrupted into as many as eight or ten quite separate heteropycnotic elements. The relationship of these to one another, and hence to the condensed Y, has only partially been worked out, and it is not certain to what degree some may be structurally meaningless artefacts. For present purposes a description is needed only of the boundaries of the most proximal elements and of the presumably undisrupted larger components. The diagram of Y (Fig. 25) thus represents larger features only, and it must be borne in mind that the major components represented, like those of the X, may perhaps be aggregates. Points at which separations frequently occur, yet which are of uncertain significance, are represented in the diagram by a small triangle over the approximate site of breakage or indenture.

The distal termination of Y^S (Figs. 10—13, 15—24) often appears somewhat thicker than its proximal segment (DOBZHANSKY 1932a) and, being immediately distal to the nucleolus organizer (Figs. 17, 18, 41, 42, 44), it is separable from the main body of Y by a clear gap (HEITZ 1933; KAUFMANN 1933, 1934). Evidently this trabant is composite, or else its chromatids tend to be delayed in their separation immediately adjacent to the nucleolus organizer, for across its proximal third or so an indenture is frequently visible at prophase (Figs. 17—20, 23—25).

The assignment and specification of the most proximal parts of both Y^S and Y^L are difficult. Very commonly the nucleolus organizer of Y^S abuts proximally on a conspicuous bead-shaped body (Figs. 11—13, 16—25), and it is this element which HEITZ (1933) holds to be the

bearer of the kinetochore forming the proximal terminus of Y^L and lying between the nucleolus organizer and kinetochore. KAUFMANN (1933, 1934), on the other hand, considers this element to be the proximal component of Y^S and, like BRIDGES (1927), he believes that the kineto-



Figs. 10—25. Differentiation of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*; 13, 18, 21, 23, 24 are of standard Y^+ from various stocks, all others are of Canton-S Y^+. A short bar above and normal to each chromosome indicates the probable site of the kinetochore (see text). Figs. 10, 11, telophase of second spermatocyte; 12, 13, anaphase of first spermatocyte; 14, second spermatocyte prophase; 15, telophase of second spermatocyte; 16—24, early (17, 18), or mid prophase of neuroblast. Fig. 25, diagrammatic representation of Y: small triangles indicate uncertain points of subdivision (see text); *C*, main secondary constriction of long arm; *K*, kinetochore; *$_LA$—$_LC$*, main segments of long arm; *NO*, nucleolus organizer; *$_SA$*, *$_SB$*, main segments of short arm; Y^L, long arm; Y^S, short arm

chore lies in (or adjacent to) the constriction separating this element from the main body of Y^L. With regard to this I must agree with KAUFMANN, for anaphasic figures are occasionally found in which the nucleolus organizer is clearly visible (Figs. 10—13) and both the terminal trabant of Y^S and the proximal bead trail the apex of the chromosome. They accordingly both lie distal to the kinetochore, and both are proper parts of arm Y^S.

In some figures, however, *two* tandem proximal, beadlike elements of similar but not equal size are clearly revealed (Figs. 16, 18—20, 22, 23, 25). Owing to failure to discover appropriate anaphasic figures, I cannot decide with certainty whether the two represent tandem components of the proximal part of Y^S that are only infrequently separated, or whether the kinetochore lies between them. Since the innermost of the two has never been seen widely separated from Y^L, whereas the proximal element of Y^S (at least as a whole) is often widely displaced from the main body of Y (Figs. 12, 18—20, 22), it is tentatively suggested that the kinetochore lies between the two elements, or is perhaps borne by the element most remote from the tip of Y^S. If this is so, Y^S and Y^L are morphologically similar immediately adjacent to the kinetochore. The short element assigned to Y^L is perhaps distally set apart by the constriction described by DOBZHANSKY (1932a) as at about one-eighth the length of Y^L from the kinetochore.

BRIDGES (1927), DOBZHANSKY (1932a), and KAUFMANN (1933, 1934) place a constriction slightly distal to the middle of Y^L (see KAUFMANN 1933, Figs. 2, 4, 17; 1934, Figs. 18, 21; and Figs. 41, 43, 44 of *this* article), and such a constriction is clearly seen in Figs. 14—18, 21, 24—29, 31. This is the only secondary constriction in Y^L that is commonly visible. Occasionally a more proximal secondary constriction is also evident, and it seems very likely that the main length of Y^L is normally subdivisible into at least three roughly equal lengths (Figs. 16—25). In addition to these PROKOFYEVA (1935) has described a subterminal constriction in Y^L which is approximately one-sixth the arm length from the distal end. Although I have also seen subdivision of the distal end of Y^L (Figs. 16, 18, 22, 23, 25), as well as of the proximal and medial thirds (Figs. 18—19, 23, 25), I do not yet know what significance is to be given these observations. My reserve is based on the fact that I have been unable to discover a consistent pattern in those arms of Y^L that show very marked subdivision (namely, from 4 to more than 6 constrictions).

The major overall structure of Y is represented in Fig. 25, where sA and sB represent the chief heterochromatic parts of Y^S, and LA, LB, and LC those of Y^L. Points at which additional discontinuities or indentures are frequently seen are indicated by small triangles. Owing to the uncertainty concerning the precise location of the kinetochore, it is possible, although unlikely in my view, that the small proximal part represented as a component of LA may be a part of sA. Finally, I have been unable to determine whether or not "paranucleolar bodies", like those of Xh, definitely occur in Y^S, although occasionally figures do suggest their occurrence.

The Cytogenetic Structure of Xh and Y

Now what sort of genetic properties must be arrayed within the Y chromosome, more especially, what are the cytogenetic correspondences and differences of Y and the heterochromatic half of X?

As STURTEVANT first suggested, and as STERN (1926, 1927) proved, both X and Y carry at least one bobbed locus; beyond this nothing is known with certainty about genetic factors that may be common to X and Y. Somehow both Xh and Y are involved in variegation, but our understanding of these effects is still too slight, and the established facts too puzzling (reviews in LEWIS 1950; COOPER 1956[1]), to permit convincing recognition of common factors. There have been reports of genes and "polygenes" common to X and Y (for example, BARIGOZZI 1952; BARIGOZZI and DI PASQUALE 1953; MATHER 1944[2]; RASMUSON 1952; WALLBRUNN 1947; etc.), but the evidence for these is at best suggestive, and in no case compelling. In contrast stand two factors, or gene complexes, that for the most part distinguish Y from X. These are the male fertility factors or sets, K_1 in the long arm and K_2 in the short arm of Y, that were first discovered and demonstrated by STERN in a series of beautiful researches (1929b). Our immediate problem, then, is to endeavor to locate bobbed$^+$, K_1 and K_2, and the limits of exchange points between X and Y, both with respect to one another and to the major constrictions of the mitotic Y chromosome.

The Location of Bobbed

In the X chromosome, as stated above, the bobbed$^+$ locus is located near the nucleolus organizer (COOPER 1958) and very likely lies in hB (if there is more than one, then they must lie closely within the same heterochromatic element). This conclusion is based on a cytogenetic study of a large series of free Xh duplications (from both Canton-S and In(1)sc^8 X chromosomes) obtained by KRIVSHENKO and me, which will be reported in detail elsewhere. Such an assignment, though tentative, agrees with results of DOBZHANSKY's (1932b) studies of Xh duplications which place the bobbed$^+$ locus at a physical distance not less than 0.5 times, nor more than 1.5 times, the length of the fourth chromosome from the right end of X, namely proximal to the nucleolus organizer and approximately in hB. To judge from LINDSLEY's (1958) recombinants of In(1)sc^8 and In(1)sc^8, ENR that have lost the y$^+$-bearing tip of sc^8, the bobbed$^+$ locus must be close to the nucleolus organizer in In(1)sc^8 as well (compare diagrams of heterochromatic lengths in LINDSLEY's table 1).

[1] In this paper I wrongly cited STERN (1929a) as having recorded the occurrence of XX3Y females; the correct reference is STEINBERG (1943).

[2] See COOPER (1945) and SCHULTZ (1948) for criticism of these experiments.

As a genetic marker is lacking for the kinetochore or a region immediately adjacent to it, crossing over cannot be measured between bobbed$^+$ and the spindle fiber locus in females bearing structurally normal X chromosomes, and it is not known whether such crossing over occurs at all. A normal X will evidently exchange rarely with an ordinary Y in the male (STERN 1926, 1929b; and others), but so far studies of these events and of the $\widehat{XY}^{Arm}$ compounds which result have provided very little information, failing to disclose both the arm of Y carrying bobbed$^+$ and whether homologous interchanges have occurred. If the a priori possibilities of recombination between X and Y are considered, and the location of bobbed$^+$ in Y is not known but it is assumed that bobbed$^+$ is located in one arm of Y only (and proximal to the K-set of that arm, see comment p. 551), then there are not less than twelve $\widehat{XY}^{Arm}$ products which must be considered (Table 1). With only fertility factors and

Table 1. *Possible constitutions of $\widehat{XY}^{Arm}$ products arising from single exchanges between X (= bb) and Y (= bb$^+$) in the male*

It is assumed that either Y^S or Y^L alone carries the bobbed locus in Y, and that bobbed lies in Xh in X. The abbreviations are: X = euchromatic length of X; bb = mutant locus originally in X, bb$^+$ = wild type bobbed locus originally in Y^{Arm}, and O^{bb} = bobbed deficiency; · = kinetochore; K_1 and K_2 — fertility factor sets of Y^L and Y^S respectively. See text for significance of the asterisked classes.

$\widehat{XY}$ Arm is	Assumption		Phenotype for bobbed
	(A) bobbed$^+$ is in Y^S	(B) bobbed$^+$ is in Y^L	
$\widehat{XY}^L$	$Xbb \cdot K_1$*	same*	bb
$\widehat{XY}^S$	$Xbb \cdot K_2$	same	bb
$\widehat{XY}^L$	$Xbb^+ \cdot K_1$*	$XO^{bb} \cdot bb^+ K_1$*	bb$^+$
$\widehat{XY}^S$	$XO^{bb} \cdot bb^+ K_2$	$Xbb^+ \cdot K_2$	bb$^+$
	$XO^{bb} \cdot K_1$*? $(= \widehat{XY}^L)$	$XO^{bb} \cdot K_2$ $(= \widehat{XY}^S)$	bb or lethal?
$\widehat{XY}^L$	$Xbbbb^+ \cdot K_1$*	$Xbb \cdot bb^+ K_1$*	bb$^+$
$\widehat{XY}^S$	$Xbb \cdot bb^+ K_2$	$Xbbbb^+ \cdot K_2$	bb$^+$

bobbed and not-bobbed classifiable, and the exchange event rare (*ca.* $2—8 \times 10^{-4}$; see COOPER 1944), it is clear that the arm of Y that carries the bobbed$^+$ locus cannot be identified from genetic experiments carried out in both a simple manner and on a relatively small scale.

Although the above must seem obvious, it will be instructive to consider as examples several actual experiments and observations upon which considerable emphasis has been placed. Thus NEUHAUS (1937b) analysed *fertile* males occurring in progenies from the cross: ♂ y bb/Y × ♀$\widehat{XX}$/Y^S. Apart from exceptional males arising from primary nondisjunction in the father, fertile sons would be expected to be only those

having a $y\widehat{bb\,Y^L}$ chromosome (carrying K_1) derived from the father and a Y^S chromosome (supplying K_2) received from the mother. Six such $\widehat{XY^L}/Y^S$ males were obtained among 26557 tested; two of the $\widehat{XY^L}$ chromosomes tested as bobbed, four as wild type for bobbed. Taken at face value these results show that X and Y must have exchanged to the right of bobbed in X in two cases at least, whether exchange is homologous or not, but they proved nothing more (*cf.* asterisked classes, Table 1). If it were *known* that these exchanges had involved only the short arm in Y, as NEUHAUS believes they did, then it would be clear that Y^S can exchange both proximally and distally to the bobbed locus in Xh, that bobbed$^+$ in Y lies between at least two exchange points in Y^S, and that Y^L is very likely without a bobbed$^+$ allele. On the other hand there is evidence compatible with the view that XR is capable of exchange (LAMY and SLIZYNSKA 1950; COOPER 1952a). With this as a possibility, as LINDSLEY (1955a) correctly points out, NEUHAUS' experiment is ambiguous. If an arm of Y may exchange with XR, then Y^S might or might not carry bobbed$^+$, and the results could be accounted for by a Y^L exchange with XR to the right or left of a bobbed$^+$ locus situated proximally in Y^L (asterisked classes in column B, Table 1). The fact that NEUHAUS (1937b) obtained no $\widehat{XY^S}$ in a comparable experiment ($\widehat{XX}/Y^L$ ♀ × X/Y ♂) of course suggests that Y^S may be the more frequent partner of X in exchange, as NEUHAUS concluded and as is reasonable on other grounds, but it does not bear on the location of bobbed$^+$ in Y. So far as I can discover, individually the recorded experiments of this sort are all subject to similar uncertainty and alternative explanation.

As has been emphasized (MORGAN 1938; MULLER and HERSKOWITZ 1954; LINDSLEY 1955a; COOPER 1956; and others), most attached-X chromosomes[1] have a proximal part or parts, probably in both limbs, derived originally from a Y chromosome. In principle a very large number of attached-X chromosomes of quite different structure may therefore exist. For example, the six basic not bobbed-deficient $\widehat{XY}^{Arm}$ types of table 1 may result in a minimum of twelve primary attached-X chromosomes that differ proximally; homozygosis may then augment this number to a total of at least twenty-six, and so on. For this reason exchanges of Y with attached-X chromosomes or their derivatives, and of normal X chromosomes with derived Y chromosomes that possess or very likely possess parts of X (such as Y^L, sc · Y, sc^{VI} · Y^S, Y^S, Y^{st}, $\widehat{Y^SY^S}$, sc^8 · Y:bw^+, etc.), are ambiguous where only genetic

[1] But theoretically not all; see COOPER 1952a.

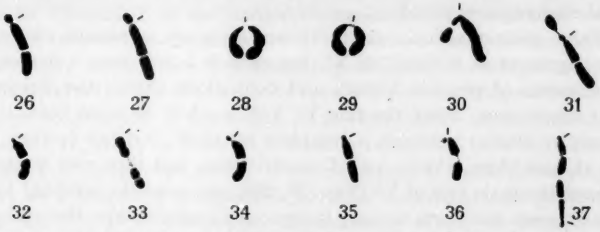
information is available, and they cannot ordinarily provide convincing evidence as to homology or the sites of exchange between a standard X and Y.

The question of the location of bobbed$^+$ in the normal Y chromosome is thus one of extraordinary difficulty, and cannot be decided with certainty on the basis of the genetic information now available. It is widely held that there is a normal allele of bobbed in Y^S and a weak ("extreme") allele in Y^L (GERSHENSON 1940; BRIDGES and BREHME 1944; and others), although some, like PHILIP (1935), regard Y^L to carry the normal allele of bobbed. PHILIP's view depended on the fact that most known X, $\widehat{bbY^L}$ (but not all, see STERN and OGURA 1931) behaved as though wild type for bobbed, whereas female $y\widehat{bbY^S}$ homozygotes with which she worked were bobbed in phenotype. Yet even were Y^S to carry bobbed$^+$, an exchange of Y^S distal to bobbed and between Y^S and XR in a ybb/Y ♂ (Table 1), or distal to bobbed in both Y^S and Xh in an attached-X $y\widehat{bbbby}/Y$ ♀[1], would give an $\widehat{XY^S}$ chromosome that carries K_2 and only the mutant bobbed locus of Xh. PHILIP's conclusion is therefore not warranted. Inconclusive for similar reasons is NEUHAUS' (1936a, b) demonstration that more or less equal numbers of X-rayed X^+ and $\widehat{XY^L}$ gave similar numbers of bobbed mutations (11 and 12 respectively), whereas a comparable number of X-rayed $\widehat{XY^S}$ gave at most one bobbed mutation. For example, if Y^L contained bobbed$^+$ proximally, Y^S not carrying bobbed at all, then the chromosomes he X-rayed could have been: normal X^+ (1 bb$^+$ locus), $\widehat{XY^SY^L}$ $(= O^{bb}\widehat{bb^+K_1})$, and $\widehat{XY^LY^S}$ $(= bb^+\widehat{bb^+K_2})$ (*cf.* Table 1). His results would therefore be understandable on this basis even though Y^L alone carried bobbed$^+$ in a normal Y chromosome. If the irradiated $\widehat{XY}^{Arm}$ chromosomes were derived by breakdown of an attached-X (as very likely the $\widehat{XY^S}$ chromosome was), then the situation may be more complex, yet interpretable in a similar manner.

Evidence for a second, "weak" allele of bobbed in Y is not good, for the prime case is that of NEUHAUS' (1936a, b, 1937b) "Y^L", a chromosome of truly mysterious origin. Prof. H. J. MULLER suggested to me (in 1949) that this free "Y^L", which presumably arose in a female of the constitution $\widehat{XY^L}/\widehat{XY^L}$, was detached by an exceptional exchange of the proximal region of the arm bearing the X with the free distal tip of the same or partner X (the reciprocal product being either an akinetic

[1] PHILIP's y $\widehat{bbY^S}$ chromosome very probably originated by detachment of an attached-X.

ring or tandem akrokinetic attached-X bearing Y^L proximally). In this case, even were the "Y^L" length of $\widehat{XY^L}$ itself identical with the long arm of a normal Y^+ chromosome from kinetochore to distal tip, the derived, free "Y^L" chromosome must have a short arm which could carry a bobbed allele derived from Y^S, Xh, or a composite of the two. The "Y^L" chromosome of MULLER's stock h6 (of D.I.S.-*21*:31, 1947), originally received from NEUHAUS, does in fact carry such a short arm, devoid of distinguishable constrictions, and on the average somewhat smaller than the fourth chromosome of that stock; the main length of the chromosome is similar to Y^L of a normal Y chromosome (Figs. 26, 27). Furthermore, if the original $\widehat{XY^L}$ chromosome of these experiments



Figs. 26—37. Gross morphology of derivative "Y" chromosomes of *Drosophila melanogaster* at prophase (33), anaphase (37), or premetaphase of neuroblasts; a short bar above and normal to each chromosome indicates the probable site of the kinetochore. Figs. 26, 27, "Y^L"; 28, 29, Y^{Lc}; 30, 31, a Y^{bb-}; 32, 33, $sc^{VI} \cdot Y^S$; 34, 35, Y^{st}; 36, 37, "Y^S"; see text

arose by an exchange of a Y^+ with an attached-X chromosome, it is entirely possible that the so-called "Y^L" arm is composite, possessing proximally a length of Xh or Y^S (including a bobbed allele). For this reason, even if it could be shown, for example, that "Y^L" had arisen by an exchange between the fourth chromosome and $\widehat{XY^L}$ to give a $4 \cdot Y^L$ chromosome (= "Y^L"), it could not be inferred from even this that Y^+ must bear an allele of bobbed in its long arm. In like manner "$\widehat{Y^LY^L}$" and "$\widehat{Y^SY^S}$" chromosomes derived from attached-X chromosomes may carry bobbed even though the particular arm of Y that is identified by the complete fertility complex present were not normally to do so, for to follow fertility sets in an experiment is not necessarily the same as following the arms of Y^+ in which they are known normally to reside. Because the "Y^L" chromosome has such an uncertain history and structure, little weight can be given to PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA'S (1937b) inference that the long arm of Y^+ carries a bobbed allele even though it is based on polytene homology of at least a part of "Y^L" with the region of Xh known to carry bobbed$^+$.

Although each experiment or observation purporting to localize bobbed$^+$ in Y appears ambiguous, it is useful to consider what placement of bobbed$^+$ in Y offers the least complicated interpretation of *all* of the experiments as a group, as well as any additional observations. If it is assumed that only Y^L carries bobbed$^+$, then XR and Xh must each have at least one point of exchange, and Y^L must be able to exchange to either side of its bobbed$^+$ locus with XR. Furthermore exchange with Xh must be asymmetrical (proximal to bobbed in Xh, distal to bobbed in Y^L), producing duplications and deficiencies for bobbed. If bobbed$^+$ is localized in Y^S, however, then Y^S may exchange at corresponding levels with Xh to either side of the bobbed$^+$ locus. No other sites of exchange need be assumed in this case, nor are asymmetrical exchanges required.

Three additional findings of different sorts are consistent with such an assignment of bobbed$^+$ to Y^S, but each is based upon a derived Y chromosome of peculiar history and none alone carries the weight of their congruence. First, the ring-Y "Y^{Lc}" ($= Y^{cl}$; MULLER 1948, 1949; LINDSLEY 1955a) possesses a complete set of K_1 fertility factors, and has at least three widely spaced constrictions, and thus very probably at least the main two of Y^L (Figs. 28, 29), but lacks the bobbed$^+$ locus, at least some short arm fertility factors, and probably also the nucleolus organizer. Were a bobbed locus normally located in Y^L, then it would either have to reside distal to the most distal fertility factor in the K_1 set, or the event giving rise to Y^{Lc} would have required a minimum of 4 breaks and not 2 (see also p. 551). Second, the relative frequencies marking the presence or loss of the bobbed$^+$ locus *when* either y^+ or bw^+ was deleted by X-ray from the very complex $sc^8 \cdot Y : bw^+$ chromosome lead to a placement of bobbed$^+$ proximal to K_2, hence in the Y^S-equivalent of this chromosome (BAKER 1955, 1957). Finally there is the bobbed$^+$-deficient Y chromosome (Y^{bb-}) that arose spontaneously in the "equational-producer" stock (SCHULTZ in: MORGAN, BRIDGES and SCHULTZ 1934, 1935; see also: p. 76, 233 in BRIDGES and BREHME 1944). This Y^{bb-} retains K_1 and K_2, but according to SCHULTZ it shows a reduction of the short arm to about one-third that of a normal Y^S. On the other hand the Y^{bb-} of MULLER's stock h2 (of D.I.S.-21:31, 1947), so far as I could make out, showed no obvious differences in arm proportions or superficial structure from a normal Y (Figs. 30, 31), and behaved similarly to a normal Y in its Y^S conjunction with X at meiosis in the male. Admittedly, then, the evidence is not decisive, but the simplest interpretations are required by all if it is concluded that Y carries but a single bobbed$^+$ locus (perhaps compound), and that this locus is situated in Y^S.

The Fertility Complexes

The fertility complexes K_1 and K_2, perhaps each consisting of five to seven or so closely clustered genes (PANSHIN and MULLER, unpubl., see: MULLER and GERSHENSON 1935; NEUHAUS 1938, 1939; MULLER 1956; BROSSEAU 1958, 1959), may have one or more homologous genes in Xh (BESSMERTNAYA 1934; MULLER 1938; NEUHAUS 1938, 1939, BROSSEAU 1959). For this reason, other information being lacking, it is entirely possible that only the most terminal member or members of each cluster lie distally to any sites of frequent exchange between Y and Xh. Whether the acquisition of the tip of $In(1)sc^8$ (bearing y^+) without loss of fertility factors in the case of $sc^8 \cdot Y$ (MULLER 1948) indicates relative inversion of fertility factors common to Xh and Y in the normal chromosomes, the occasional occurrence of inverted Y-chromosomes in otherwise normal stocks (perhaps unwittingly derived from irradiation experiments), of multiple inversion in the tip of sc^8, or the occurrence of inverted, non-homologous exchange, cannot be decided. Nevertheless it is clear that exchange distal to either set K_1 or K_2 must be an extremely rare event between a normal X and Y, if it happens at all. Were exchanges to occur distally to K_1 or K_2 at a frequency comparable to those occurring more proximally then XY^{Arm}. Y^{Arm} compound chromosomes would be formed that would be fertile as apparent $\widehat{XY}^{Arm}/O$ males. Though easily detectable both genetically and cytologically, and indeed found by PARKER (1954) and PARKER and MCCRONE (1958) following irradiation of attached-$X/sc^8 \cdot Y$ females, no such compound $\overline{XY}^+$ chromosome has been reported arising spontaneously in this manner. Most exchanges between X and Y^+, therefore, either lie proximal to K_1 and K_2 or fall within the clusters; it also follows that the bobbed$^+$ locus must lie proximal to the K-set of its arm. Regardless of the interpretation of origin of the Y chromosome derivatives, whether or not they were preceded by Y^{Arm} inversion, the formation of $sc^8 \cdot Y$, Y^{Lc}, $sc^8 \cdot Y{:}bw^+$, and of the remarkable ring-Y bearing K_1, K_2 and bw^+ ($= Y^c{:}bw^+$; OSTER and IYENGAR 1956) shows that some chromosomal material must lie terminal to the K-set in each arm of Y^+.

Other Factors in Y

It is at present extremely doubtful that the proximal regions of the two arms of Y, extending from bobbed$^+$ in Y^S and from K_1 in Y^L to the kinetochore, are genetically inert as NEUHAUS (1938, 1939) and KHVOSTOVA (1941) have inferred. There is evidence that, in addition to the K_1, K_2 groups, there is some other element or elements in Y having an effect on fertility in hyperploid males (COOPER 1956), very

likely lying proximally to the K_1 and K_2 sets. Furthermore there is "M_y", DUBININ's and HEPTNER's (1935) factor or factors affecting the expression of bw^A, also attributable to the proximal regions of Y and not to be identified with the bobbed$^+$ locus or the K-sets although possibly with an element in Y homologous to XR. That a part of XR may be an active region, and not indispensible, must also be considered. Since an XR homolog may be carried in either or both arms of Y, the viability and phenotypic normality of attached-X/O females does not demonstrate that XR is dispensible; such females may carry its equivalent in either or both arms of the attached-X, being derived originally from X, the proximal region of Y, or from both. That at least the distal tip of XR may be dispensed with follows from the existence of standard homozygous stocks bearing a duplication on XR; e.g., MULLER's stock of y sc In49 v g · Dp($sc^{VI}y^+$) (= b115; D.I.S.*31*: 15, 1957), y^2 apr cv vf · Dp(1)112, and others. Finally, there are the additional genetic attributes claimed for Y that have not yet been localized and which therefore must be considered as possible proximal entities in Y. For example: there are perhaps the factor or factors affecting the expression of certain yellow and achaete loci which permitted NOUJDIN (1947) to distinguish five different Y^+ chromosomes, the "discrete functional units" in Y, deduced by BAKER and SPOFFORD (1958), that modify the expression of a white insertion into the heterochromatic region of 3L, and possibly also factors that suppress the expression of certain radiation-induced recessive lethals in the X chromosome (see LINDSLEY, EDINGTON and VON HALLE 1958).

Although at present all of the above may be viewed as no more than contingencies, they nevertheless seem sufficient likelihoods to warrant caution before disposing of the medial length from bobbed$^+$ to K_1 as an inactive region. Indeed it will be shown in a subsequent cytogenetic account of bivalent formation in the male that at least one site of meiotic pairing occurs in Y^S and in Y^L in this region (see Figs. 29, 33, 35 in COOPER 1949; also 1952c), and indeed very likely two in Y^L, much as GERSHENSON (1940) concluded from segregation studies of duplications.

The Probable Sites of Exchange

The fact that both $\widehat{XY^S}$ and $\widehat{XY^L}$ chromosomes, however they were initially formed, may give rise to attached-X chromosomes proves that at least one arm of Y can exchange with Xh and that either the other arm can similarly do so, or that the two arms of Y can exchange with each other at levels proximal to the first exchange with X. In the latter case, and without multiplying assumptions, the commonly exchangeable parts must be supposed to lie decidedly proximal in Y (or

adjacent to sA and proximal segment of LA, for otherwise the morphology of derived fertile Y chromosomes would be variable, which does not seem to be the case[1]. For this reason, $\widehat{XY^L}$ and $\widehat{XY^S}$ chromosomes would be expected to produce attached-X chromosomes at similar rates. That they do not always do so, at least in the presence of a competing Y-element in males, has been shown by NEUHAUS (1936a, b, c, 1937b). Males of the constitutions $\widehat{XY^S}/Y$ and $\widehat{XY^S}/Y^L$ give rise to recoverable attached-X chromosomes at rates 10- to 50-fold that of $\widehat{XY^L}/Y$ males. Regrettably NEUHAUS' (1935, 1936a, b) extensive experiments with $\widehat{XY^S}/\widehat{XY^S}$ and $\widehat{XY^L}/\widehat{XY^L}$ females give an inconclusive result with respect to this problem. Although attached-X chromosomes were actually recovered only from homozygous $\widehat{XY^S}$ females (4 in 141095 female progeny), this finding is not significantly different from that of the corresponding series of $\widehat{XY^L}$ females (0 in 85889).

Inasmuch as the morphology of Xh, Y^S and Y^L is for the most part distinctive, some conclusions can be drawn from exchange products to points at which Xh and Y may exchange. Most reliable are those from primary X and Y exchanges, less so those from derived XY-compounds (as $\widehat{XX}$, $\widehat{XY}^{Arm}$ originating from $\widehat{XX}$, and so on). Only a small number of cases permitting analysis are available.

A direct exchange of Y with the proximal region of $In(1)sc^{vl}$ (a perikinetic inversion of nearly the entire X) resulted in the $sc^{vl} \cdot Y^S$ chromosome (MULLER 1948). This derivative chromosome has a tiny second arm (= sc^{vl}-duplication, probably carrying the base of XR adjacent to the kinetochore, sc^+, ac^+, y^+, telomere-XL in that order), and a long arm similar in size and gross appearance to the whole of Xh (Figs. 32, 33; from MULLER stock h66 of D.I.S.-*22*: 29, 1948). This fragment, then, requires an exchange of Y^S with Xh of $In(1)sc^{vl}$, and eliminates all but sB and the most distal tip of sA in Y^S, and XR, hA, and most of hB in X as possible points of exchange in its origin.

Y^{st} (Figs. 34, 35), of spontaneous occurrence in a bobbed-lethal stock (MORGAN, STURTEVANT and BRIDGES 1926), and NEUHAUS' Y^S (Figs. 36, 37; also 1—6 in COOPER 1948; — all from MULLER's stock h8 of D.I.S.*21*: 31, 1947) are morphologically equivalent, and very similar to $sc^{vl} \cdot Y^S$. Although definite details concerning their origins are

[1] The products of oblique exchange between the arms of Y would be duplication-deficiencies for fertility factors, hence simulate sterility mutations. To judge from known exchange rates between X and Y, and in $\widehat{XY}^{Arm}$ chromosomes, it is unlikely that such dp-df chromosomes could contribute significantly to the high frequency of genetic sterility (0.34%) found by HANNAH and STERN (1952) among sons of attached-X, B bb/Y females.

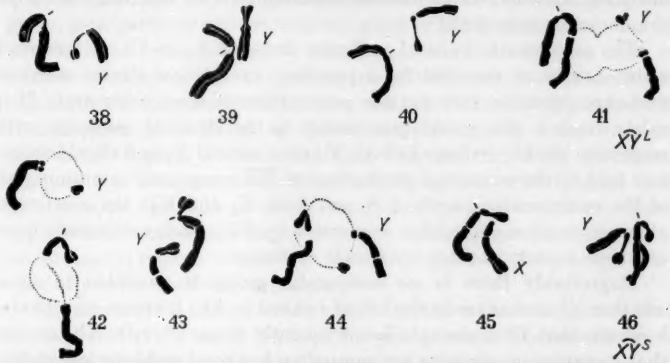
unrecorded, it is nevertheless significant that, as in $sc^{VI} \cdot Y^S$, the distinctive sA element in Y^S is not represented in them. Y^S, or a Y^S derivative must therefore have exchanged in some region distal to all but the very tip of sA, and in Xh distal to most or all of hB.

The tandem attached-X derived from a female of the constitution $In(1)sc^8/\widehat{XY^S}$ could have originated, as MULLER (1944c) suggests, by exchange between the proximal region of $In(1)sc^8$ (in hA) and the Y^S arm. But it could also have resulted from exchange between XR of $In(1)sc^8$ and the proximal region of the X (derivable either from Y^L or Xh) of the $\widehat{XY^S}$ chromosome. As a matter of record, NEUHAUS' (1937a) comparable experiment gave no detected $In(1)sc^8\widehat{Y^L}$ chromosomes among somewhat more than 5000 tested sc^8-chromosomes in males of the progenies of $In(1)sc^8/\widehat{XY^L}$ ♀♀ by $\widehat{XY^L}/Y^S$ ♂♂.

KAUFMANN's (1933) figures of $\widehat{XY}^{Arm}$ chromosomes resulting from the breakdown of attached-X chromosomes by exchange with Y chromosomes permit still additional deductions. In analysing them it must be kept in mind that their peculiarities may reflect a consequence of the primary exchange that produced an initial $\widehat{XY}^{Arm}$ (and hence may involve XR), of the secondary exchange that gave an attached-X, of homozygosis, or finally of the tertiary or quaternary exchange with Y that disrupted the attached-X. The $\widehat{XY^L}$ detachment-e (Figs. 38, 39; redrawn) at some point involved Y^S in the region between the most distal factor of K_2 in sB and, most proximally, the distal tip of sA. The exchange point in Xh could be in the region from hD to the distal end of hB. $\widehat{XY^L}$ detachment-b (Figs. 40, 41; redrawn) shows the consequences of exchange either proximally in both Y^S and Xh, or in both Y^L and XR, inasmuch as Xh and Y^L evidently retain their normal morphology. Likewise the $\widehat{XY^S}$ detachments-a (Figs. 42—44; redrawn), -c (Fig. 45; redrawn), and -g (Fig. 46; redrawn) indicate proximal exchange in Y^S (between sA and the kinetochore) or in Y^L (but not distal to LA), because the gross morphology of Xh is not detectably altered. In the former case exchange in Xh must be proximal, in the latter it need merely be proximal to the nucleolus organizer. Finally NEUHAUS (1939) points out that "giant" $\widehat{XY^S}$-chromosomes would be produced by exchanges involving the distal length of Y^L and Xh, but none have been found.

Taking all of the above together, despite the obvious uncertainties attendant upon conclusions reached from derived XY-compounds, only the distal extremity of Y^S, and of Y^L distal to LA, lack evidence consistent with exchange within them. This is, of course, in good agreement

with the nearly terminal placement of sets K_2 and K_1. So far as Xh and XR are concerned, no region within them can at this time be regarded as free of exchange, although none of the results so far *require* exchanges in the medial length of the region from the nucleolus organizer to the kinetochore (that is, in the length: proximal half of hB to distal half of hA). The absence of duplicated, tandem nucleolar organizers among these chromosomes is consistent with the view that in a given exchange between Y^S and Xh, the interchange occurs at points either



Figs. 38—46. $\widehat{XY}^{Arm}$ chromosomes resulting from detachment of attached-X by exchange with *Y*; redrawn, freehand, and adapted from KAUFMANN (1933), *q.v.* As before, a short bar indicates the probable site of the kinetochore in each $\widehat{XY}^{Arm}$ chromosome. Figs. (bracketted number is that of Kaufmann's original): 38 (14), 39 (15), $\widehat{XY}^{L}$ detachment-e; 40 (16), 41 (17), $\widehat{XY}^{L}$ detachment-b; 42 (5), 43 (4), 44 (2), $\widehat{XY}^{S}$ detachment-a; 45 (9), $\widehat{XY}^{S}$ detachment-c; 46 (6), $\widehat{XY}^{S}$ detachment-g; see text

proximal to the nucleolus organizers in both chromosomes, or distal in both, when the chromosomes are in normal sequence.

The exchange points between Y^S and the distal, *inverted* Xh region of In(1)sc^8 which give free, kinetic products and not bridges have been the subject of a fine and detailed analytical study by LINDSLEY (1955a). Eliminating as they do both XR and Y^L, these may have bearing on the details of exchange between a normal X and Y^S provided that Xh in In(1)sc^8 contains re-inverted material, perhaps as PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA (1939a) claims for so-called simple breaks, or that these regions are duplicated as NOUJDIN (1938) contends, or that they have the structure of reversed repeats, or, finally, as LINDSLEY postulates, that the sequential order of the finer parts (if any) of a region of exchange is without significance in the process. LINDSLEY's findings do not require

Y^S to carry a bobbed$^+$ locus[1], certain conditions holding if it does, others if it does not. If bobbed$^+$ lies in Y^S, as we have concluded, then LINDSLEY's findings prove that exchanges may occur to both sides of bobbed$^+$ in Y^S. Furthermore, because the products of all exchanges between Y^S and Xh (sc^8) are not members of a unique reciprocal pair, it is clear that exchange cannot solely involve the nucleolus organizer in the manner that KAUFMANN (1933) tentatively suggested. Deficiencies for bobbed definitely occur among the exchange products, hence very likely also do bobbed duplications, and duplications and deficiencies for the nucleolus organizer.

The problematical site of exchange distal to K_2 in Y^S, by means of which LINDSLEY accounts for a puzzling, exceptional cluster (67h) of exchange products, may involve peculiarities of some other sort. If it exists, such a site would presumably be in identical sequence with respect to the kinetochore in both Y and a normal X, and should therefore lead to the occasional production of $\overline{XY}$ compounds containing all of the euchromatic length of X and both K_1 and K_2. As mentioned above in another yet similar connection (p. 551), such compounds have not been reported arising by simple exchange.

Regrettably there is no comparable evidence available to show whether Y^L exchanges to the left of bobbed in Xh; it seems very likely, however, that Y^L exchanges less frequently than Y^S with Xh, or else that its exchange products are more often less recoverable or less viable. LINDSLEY's (1955b) clever experiment, unambiguously identifying the synaptic arm of Y involved in exchange and detachment at the medial heterochromatic region of a compound, akrokinetic X, shows Y^S to have been the synaptic arm in 23 of 26 cases in which a complete K_1 or K_2 fertility set was recovered. Inasmuch as the origin of the reversed akrokinetic X involved an $\widehat{XY^L}$ exchange with the distal end of In(1)sc^8 (NOVITSKI, p. 128, S. 1954), it is possible that the region for which Y^S and Y^L presumably compete in synapsis bears a section derived from Y^S and that the results are biased in this way.

The Blocks

Of the 1024 bands which BRIDGES (1938) has represented in the polytene map of the X chromosome, no more than 25 to 30, or less than 3% of all that are so far known, lie proximally to the leftmost limit of Xh perhaps located at 19 EF (PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1935b, c) and of these only about 17 are truly chromocentral. Nevertheless about half of the bulk of the metaphase X chromosome is made up of Xh + XR

[1] Since the critical recombinant chromosome, YB2, is in fact a sc^{Sl}c.o.Y and not a derivative of the sc^8 experiments (confirmed by LINDSLEY, in letter).

and it would seem that the sharp cytological distinction between isopycnotic and heteropycnotic regions at prophase, metaphase, and anaphase must reflect a large difference in the physical minute architecture of the two regions at these periods at least (MULLER and GERSHENSON 1935; MULLER and PROKOFYEVA 1935; MULLER, RAFFEL, GERSHENSON and PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1937; MULLER 1938, 1943, 1944a, b, 1954; GERSHENSON 1940; RAFFEL and MULLER 1940). To judge from BRIDGES' map, the mean linear dimensions of bands seem alike in Xe and Xh. Therefore, whether bands represent gene loci, genes, gene parts, or spacers between genes or loci (to mention a number of admissable possibilities), it seems reasonable to suppose that at mitosis the chromonematal counterparts of the bands are also similar to one another in magnitude. If so, these elements should be approximately 15-fold (from 7- to 30-fold as limits) more compactly ordered in the isopycnotic regions of the condensed chromosome, some additional component or components therefore making up from 85% to more than 95% or so of the bulk of the heteropycnotic region at mitosis. Such hypothetical components might or might not be present in isopycnotic (euchromatic) regions as well but, if so, they must on the average be in relatively very small amount there.

MULLER and his associates (see references above) have suggested that at least some of the loci of Xh have the production and accumulation of accessory materials about them as a mitotic function or attribute. In this way such loci could contribute a disproportionately large bulk to the condensed chromosome. Were this so, and all of the loci of Xh were alike in this respect, then removal of but one of these loci would reduce the chromosome as a whole by one or two percent. On the other hand, if only certain loci in Xh were bulk formers, and these few in number, then each would act as a cytologically sizeable block because loss of but one of them would reduce the chromosome by some constant amount (perhaps unique for that locus) that could lie between 2% and nearly 50% of the entire X chromosome. Results from the study of free duplications and deletions of Xh, and of certain rearranged X chromosomes, were taken as an indication that much of the bulk of Xh at mitosis, indeed from 20% to 40% or more of the whole X chromosome, is the contribution of but one locus or band in Xh. Not only did this block, "block A", seem to resolve much of the perplexing size difference between Xe and Xh, but by its very existence several other peculiarities of Xh could be explained as well (for example, the relative genetic "inertness" of Xh, peculiar radiation breakage properties of Xh, and so on).

GERSHENSON (1940) has presented what now appears to be the chief and most detailed evidence for the existence and location of large blocks

in Xh. Measurements at oogonial metaphase of some 33 free duplications derived from Xh + XR (by X-ray, and possessing only a minute terminal length of XL) are said by him to fall into three size classes only: 16 duplications not distinguishable in size from chromosome 4 (and hence about one tenth the length of X), 6 duplications approximately one-quarter the length of X, and 11 duplications about half the length of X. Furthermore the dimensions of oogonial metaphase X chromosomes, derived by crossing over between inversions, which bear deficiencies (sc^4—sc^8, sc^4—sc^{L8}, w^{m4}—sc^8, . . .) and duplications (sc^8—sc^4, sc^{L8}—sc^4, sc^{L8}—sc^8, . . .) of Xh were found to be consistent both with the evidence provided by the known breakpoints in the parent inversions and with that from the series of 33 free duplications of Xh + XR. Thus these X chromosomes also fell into three size classes only: those exchange products roughly three quarters the length of a normal X (sc^4—sc^8, sc^4—sc^{Sl}, sc^{L8}—sc^8, sc^{L8}—sc^{Sl}, w^{m4}—sc^8), those evidently unchanged in length (sc^4-sc^{L8}, sc^{L8}—sc^4), and those approximately one and a quarter times normal (sc^8—sc^4, sc^8—sc^{L8}, sc^{Sl}—sc^{L8}). Furthermore it would seem that the bobbed locus itself contributes very little to the bulk of Xh because chromosomes judged to be of normal length can be obtained which are deficient (sc^4—sc^{L8}) or duplicated (sc^{L8}—sc^4) for the bobbed locus. All of these results, GERSHENSON concludes, can be accounted for by the block hypothesis under the assumption that two blocks of unequal length make up 70% to 80% of the heterochromatic region of X (with block A about 50% and block B some 20% to 30% of Xh + XR). A map summarizing GERSHENSON's analysis, running from the euchromatic-heterochromatic junction (E-H) to the left, through XR to the right, may be represented thus[1]:

$$\underset{(\sim 50\%)}{\text{E-H...bb}^{+}\text{...block A...}} \underset{(20\text{—}30\%)}{\text{block B...kinetochore...XR}} \qquad (1)$$

However, it can readily be shown that this map cannot be correct[2], and that whatever blocks as may comprise Xh cannot individually be of great size. Certainly none can exceed 25% of Xh (as the cytologic differentiation of Xh also suggests, see Figs. 1—9), and probably any block will be found to be less than half of this, namely less than 12% of the entire X chromosome. This conclusion is reached in the following

[1] GERSHENSON's data are conflicting with respect to the location of bobbed. Some of his results are consistent with the location given [which is correct as judged from the rightmost breakpoints of $In(1)sc^{L8}$ and $In(1)sc^8$], others with a location of bobbed *between* blocks A and B.

[2] For the most part the errors of this map very likely reflect the unsuitability of oogonial metaphase X chromosomes for a study of this sort. Ordinarily these chromosomes do not show the limit between the heterochromatic and euchromatic regions, and they are much too small for exacting measuring and differencing in the manner so painstakingly attempted by GERSHENSON.

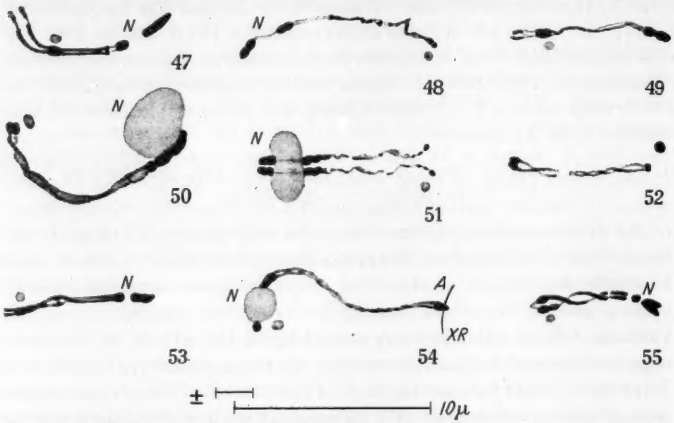
way. Block A is defined as a region lying between the rightmost breakpoints of In(1)sc^{L8} and In(1)sc^{8} (MULLER, RAFFEL, GERSHENSON and PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1937; GERSHENSON 1940; RAFFEL and MULLER 1940). Block B is, in comparison, poorly defined, for it is specified by GERSHENSON as lying between the rightmost breakpoint of In(1)sc^{8} and the leftmost points of breakage in Xh that give origin to duplications of GERSHENSON's smallest class (namely, those duplications ~ chromosome 4) (GERSHENSON 1940). Inasmuch as In(1)sc^{4} has its rightmost breakpoint to the left of bobbed (GERSHENSON 1933), and as both the sc^{4}—sc^{8} and the sc^{4}—sc^{L8} crossover chromosomes are deficient for bobbed (GERSHENSON 1933, 1940), it follows that the sequence of significant loci and breakpoints (= †.../, with †4/being that giving duplications ~ chromosome 4) in Xh must be:

$$\text{E-H}\ldots\dagger\text{sc}^{4}/\text{bb}^{+}\ldots\dagger\text{sc}^{L8}/\underset{(\sim 50\%)}{\text{block A}}\ldots\dagger\text{sc}^{8}/\underset{(20\text{—}30\%)}{\text{block B}}\ldots\dagger 4/\ldots\text{kinetochore XR} \quad (2)$$

Now the nucleolus organizer lies in the midregion of Xh (Figs. 1—9). Since block A is judged to be approximately half of Xh + XR, it must lie wholly to one side or the other of the nucleolus organizer; in any other position it would necessarily be transected and thus not a unit block as defined. But block A cannot lie to the left of the nucleolus organizer because In(1)sc^{L8} inverts the nucleolus organizer (Fig. 54; also KAUFMANN 1944) but not block A. Furthermore block A cannot comprise much more than half of the region of Xh to the right of the nucleolus organizer (namely hA and hB of fig. 9), because In(1)sc^{L8} also inverts a sizeable piece of proximal heterochromatic materials (probably of hB, *cf.* Figs. 9 and 54) along with the nucleolus organizer.

Furthermore it appears impossible that a sizeable block lies to the right of the proximal break of In(1)sc^{8}, as GERSHENSON contends, because the entire uninverted heterochromatic rightmost ends of both In(1)sc^{8} (Figs. 51, 52) and In(1)sc^{S1} (Fig. 48) consist of not much more, on the average, than perhaps a third of chromosome 4. Nevertheless, since GERSHENSON did obtain free duplications from Xh + XR comparable in size to chromosome 4 (as have KRIVSHENKO and I) and since a small translocation from the distal end of In(1)sc^{8} to chromosome 4 has been obtained (MULLER, RAFFEL, GERSHENSON and PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1937), it follows that at least one breakpoint lies within the region that spans the proximal breaks of In(1)sc^{L8} and In(1)sc^{8}, namely within the length originally defined as block A (Fig. 54, A). Thus the maximum heterochromatic piece assignable to block A is again reduced, and can consist of no more than 10% to 15% of Xh + XR (or less than 8% of the entire X), comprising a region adjacent to the proximal breakpoint of In(1)sc^{L8} and lying between the proximal break-

points of In(1)sc^{L8} and In(1)sc^{8}. Although there is no large heterochromatic block lying to the left of the kinetochore and to the right of the proximal break of In(1)sc^{8} (Figs. 51, 52), as required by GERSHENSON's definition of Block B, there is in fact a corresponding section *to the left of the sc^{8}-breakpoint* which lies between the leftmost proximal breakpoint that gives free duplications similar in size to chromosome 4, and the right break of In(1)sc^{8}. This region may be indicated as "B'" and, if it



Figs. 47—55. Inversions with breakpoints in Xh of the X chromosome of *Drosophila melanogaster* at early (48—52, 54) and mid (47, 53, 55) prophase of neuroblasts; kinetochore and XR to right in every case. A fourth chromosome has been drawn adjacent to each inversion as a means for estimating relative sizes of inverted heteropycnotic regions. A denotes the region in which block *A* lies; *N*, the nucleolus (Figs. 50, 51, 54) or nucleolus organizer (Figs. 47, 48, 52, 53, 55); *XR*, the right arm of X. Fig. 47, In(1)K (KRIVSHENKO 1956); 48, In(1)sc^{SI}; 49, In(1)bb^{-}; 50, In(1)sc^{4}; 51, In(1)sc^{8} in homozygous female; 52, crossover product: Ins(1)sc^{4}—sc^{8}; 53, In(1)rst^{2}; 54, In(1)sc^{L8}—note that the curved line passing throught the right end of the chromosome marks off the location of "block A" (see text); 55, In(1)w^{m4} in homozygous female

is a block, as "block B'" as LINDSLEY (1958) has designated it. B' thus roughly corresponds with the more proximal, second block which (along with block A) had been inferred to lie between the rightmost breakpoints of In(1)sc^{L8} and In(1)sc^{8} (MULLER, RAFFEL, GERSHENSON and PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1937; see p. 91 where this second block is tentatively designated as "block B"). Comparing now the situation in Xh + XR with the original map (1 and 2 above), the sequence and proportions become:

E-H...†sc^{4}/bb^{+}...†sc^{L8}/blockA...†4/(B')...†sc^{8}/...kinetochore...XR (3)
(~15% Xh) (~12% Xh)

KAUFMANN's (1944, 1954) criticism of block A is based on a similar analysis, and he has shown that at least one breakpoint lies within Xh to each side of the nucleolus organizer; that is, Xh has at least four parts in addition to the nucleolus organizer, which itself may be divisible. Very likely, however, Xh is divisible into not less than eight parts, and probably more. Figs. 47—55 represent fairly typical neuroblast prophasic X chromosomes of a series of frequently used or especially significant X chromosome inversions. Of these, only In(1)rst^3 (KAUFMANN 1942) appears to have been figured before. The sizes of the inverted pieces of Xh, as adjudged from a large number of cases, forms the following increasing series:

$$\text{Ins(1)}: \text{sc}^4 < \text{w}^{\text{m4}},\ \text{K},\ \leqslant \text{rst}^3 < \text{bb}^- < \text{sc}^{\text{L8}} < \text{sc}^8,\ \text{sc}^{\text{S1}}.$$

Since the nucleolus organizer subdivides Xh, and In(1h)sc$^{\text{V2}}$ presumably has its rightmost breakpoint lying between that of In(1)sc^8 and the kinetochore (MULLER and VALENCIA 1947), and inasmuch as free duplications bearing XR and y$^+$ may be formed by radiation fragmentation of sc^8 chromosomes, it follows that there are not less than eight separable heterochromatic lengths in Xh. The loci of the rightmost breakpoints of the deficiency in In(1)bb$^-$, of the likely deficiency in In(1)sc$^{\text{L8}}$ (COOPER 1958), of the breakpoints giving duplications approximately equal to chromosome 4, and of the known breakpoint lying within the region between the proximal breaks of In(1)sc$^{\text{L8}}$ and In(1)sc^8, if all different, would increase the number of separable pieces to at least 12, of which 4 would lie in hD + hC, and 8 in hB + hA. Because the lack of suitable genetic techniques for testing small deficiencies in Xh and the difficulties of exacting polytene and neuroblast analysis all tend to reduce the precision of resolution of differences among separated parts of Xh, it is reasonable to conclude that Xh is breakable at many more points along its length than has hitherto been thought. The largest blocks in Xh, therefore, must be relatively small in physical size, and hA, hB, hC and hD are each larger than any single block that may exist in Xh. Likewise XR is not a single block, for it too has been shown to be divisible (MULLER and VALENCIA 1947) at a point that is almost certainly not immediately adjacent to the kinetochore. It is therefore concluded that the heterochromatic right half of X is breakable at many points along its length, and is accordingly without any large blocks in the original sense. It is not at present known whether the Y chromosome is partially constituted on a large block basis, although this has been suggested by MULLER, PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA, NEUHAUS, and others, for necessary studies have not been made. Very likely, however, the Y chromosome is on the whole similar to Xh in its physical constitution, and like it will prove divisible at many points along its length.

A Cytogenetic Map of the Heterochromatic Region of X

Diagram 56 summarizes the cytological landmarks of the heterochromatic right half of X, as well as those placements of the mapable elements and breakpoints that have been discussed in this paper. Although only infrequently seen at stages later than prophase, the nucleolus organizer at metaphase and anaphase proves to be located at from a third to a fourth of the length of X from the proximal end. When the condensation and variable stretching of the euchromatic length of X is taken into consideration, no less the information provided by XY bivalent configurations at spermatogenesis (COOPER 1949, 1950), the conclusion seems inescapable that the elements of Xh (namely hA—hD) bear much the same general proportions to one another at metaphase and anaphase as they do at prophase; assuredly there is no drastic differential contraction of the heterochromatic region distal to the proximal break of In(1)sc^{L8} that reduces it, relative to the proximal length, by some tento thirty-fold (*cf.* pp. 119—120, and Fig. 6, in LINDSLEY 1958).

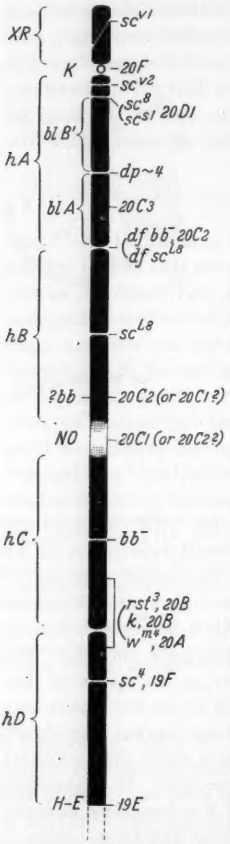


Fig. 56. Cytogenetic map of the heterochromatic right half of the mitotic X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *To the left*, localization of the main known parts of the right half of X: *XR*, right limb of X; *K*, kinetochore; *hA*, *hB*, *hC*, *hD*, the main heterochromatic segments of the left limb of X; *bl B'*, block B' (see p. 560); *bl A*, block A; *? bb* tentative assignment of the bobbed locus (the uncertainty is discussed on pp. 545—550); *NO*, nucleolus organizer (cross-hatching indicates location of "paranucleolar bodies", see pp. 541—542); *H-E*, heterochromatic euchromatic junction. *To the right*, known breakpoints of: Inversions (1): sc^{V1}, sc^{V2}, sc^{8}, sc^{S1}, sc^{L8}, b b^{-}, rst^{3}, K, w^{m4} and sc^{4}; of deficiencies bb^{-} and sc^{L8}; and of break giving Xh-duplications comparable in size to chromosome 4 (dp ~ 4). Compatible assignments on BRIDGES' (1938) map of the polytene X are given for breaks and loci when available

It is of considerable interest to locate as many as possible of the breaks and elements on BRIDGES' (1938) polytene map. Consistent placements, admittedly of very tentative character, are therefore indicated to the right of the figure and adjacent to the symbol of the element or break for which there is a published assignment. Considering the

enormous difficulty of localizing breaks within the polytene chromocentral region, it is not surprising that most authors have been able to give no more than some more or less restricted length in which a given break or locus may be located. However, since the seriation given in diagram 56 is taken to be substantially correct, specific choices of map loci from available ranges were not wholly free, and it is believed that the assignments given are as close as can usefully be made at present. Certainly they will have served their function if they no more than stimulate a retesting and remapping in this region of the chromosome. It may be noted, for example, that the assignments awaken a strong suspicion that there still remains a right hand section or sections of chromocentral X yet to be discovered and that the euchromatic-heterochromatic junction (H-E) may *not* correspond exactly with the junction between the isopycnotic and heteropycnotic portions of the mitotic X.

Each break or element, with its map assignment in diagram 56, its published available inclusive map range (in parentheses), and authority may be listed as follows:

Kinetochore	20F (20F) BRIDGES 1938; PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1939a.
sc^8, prox break	20D1 (20B—20D1)[1] PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1937b, 1939a, 1947; SCHULTZ in BRIDGES and BREHME 1944; GERSH 1949; SCHULTZ and REDFIELD 1951.
block A	20C3 (20C) KAUFMANN 1944.
df bb^-	20C2 (20CD) SCHULTZ in BRIDGES and BREHME 1944.
bobbed[2]	20C2 or 20C1? (19F—20D1) SCHULTZ in MORGAN, BRIDGES and SCHULTZ 1935, in BRIDGES 1938; TINIAKOV 1936; PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1937a, b, 1939a.
Nucleolus Organizer	20C1 or 20C2? (20B—20D) SCHULTZ and CATCHESIDE 1937; BRIDGES 1935, 1938; KAUFMANN 1938,1939, 1942; SCHULTZ 1941.
bb^-, prox break	— (19F) SCHULTZ in BRIDGES and BREHME 1944; not used, for inconsistent with other inversion breakpoints.
rst^3, prox break	20B (20B) KAUFMANN 1942, 1944.
K, prox break	20B (20B) KRIVSHENKO 1956.
w^{m4}, prox breal	20A (19F—20F) STONE and THOMAS 1935; PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1947.
sc^4, prox break	19F (19F—20C1.2) PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1937b; SCHULTZ in BRIDGES and BREHME 1944; SCHULTZ and REDFIELD 1951.
H-E junction	19E (19E—20B1) PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1935b, c, 1937a, b; KAUFMANN 1939a.

[1] Homologizing the extreme right end of PAINTER's map with BRIDGES' is a matter of considerable uncertainty. However, to judge from the placement of the right break of sc^8 on PAINTER's map by STONE and THOMAS (1935), it is possible that this break lies somewhere in 20EF.

[2] For reasons that have been fully discussed, there is little doubt that bobbed lies close to the nucleolus organizer. Although evidence from duplications *suggest* that it most probably lies proximal to the nucleolus organizer, it is not certain at this time.

So far as Y is concerned, the cytologic map of the chromosome at mitotic prophase (Fig. 25) shows no necessary morphologic homologies with Xh or XR aside from the presence of the nucleolus organizer in Y^S. Perhaps bobbed$^+$, along with the nucleolus organizer and adjacent elements, are in similar array and correspond over some length of Y^S, locus for locus, with Xh, and in the same sequence from genetic left to right (i.e., with respect to the kinetochore). If so, purely homologous exchange in the ordinary sense could occur in at least the ..NO.bb$^+$.. regions of Xh and Y^S. Certainly there is evidence that the polytene Y has bands which synapse with at least some of those of the chromocentral portions of X (PROKOFYEVA 1935; PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1935a, b, 1937a, b; KAUFMANN 1939b), and indeed in the region of 20 C at which the bobbed locus of X appears to reside. But a whole new analysis of the polytene Y is needed before the structural homologies can be made out with reasonable certainty at this level.

As indicated above, the fertility complexes very likely are clustered in each arm and interstitial. Thus set K_1 might lie most anywhere in Y^L, except at the very tip of segment LC. Set K_2 almost certainly lies in SB of Y^S, distal to bobbed$^+$, and also in a non-terminal position. The presumed proximal factors in Y (such as that thought to affect fertility in hyperploid males, "M_y", and so on) may lie most anywhere in the region that spans the kinetochore between the distal factors of K_1 and K_2. Since for most regions of Y there is no known correspondance with Xh, the exchanges between Xh and Y may frequently depend upon events quite dissimilar from those leading to ordinary crossing over at meiosis.

The Cytogenetic Attributes of the Major Heterochromatic Regions of *Drosophila melanogaster*

Discoveries and interpretations of genetic and cytologic peculiarities of Xh and Y in *Drosophila melanogaster*, especially by MULLER (1914, 1918, and more recently), MULLER and PAINTER (1932), and HEITZ (1933a, b, 1934, 1935, 1956), form the foundations upon which now rest most of the central ideas concerning "heterochromatin", for only with *Drosophila* has it been possible to couple very detailed genetic and cytologic knowledge. At the outset, HEITZ had defined heterochromatic elements in a manner similar to, but not identical with, the broader criteria employed in the recognition of heteropycnotic components (see SCHRADER 1928). Thus HEITZ' (1928, 1929) usage initially designated as heterochromatic only the more extreme cases of positive heteropycnosis, namely those in which chromosomal components possess not only a dense, compact structure in telophase and earliest prophase, but during interphase as well. Chiefly on the basis of overall genetic inertness of

the heterochromatic Xh and Y in *Drosophila*, but partly also on BOVERI's conjecture that the genetic components of a chromosome are active during the diffuse, decondensed, intranuclear stage but inactive within condensed chromosomes at mitosis, HEITZ (1932, 1933, 1935) emphasized the hypothesis that permanent ("telophasogenic") heterochromaty connotes genic passivity, inertness, or even the absence of genes. The discoveries and views of HEITZ and MULLER have been of enormous significance in the stimulus they have given to cytogenetic investigation, but the extreme views now widely held by cytologists and geneticists require modification. It is therefore useful to review the cytogenetic relations and significance of heterochromaty as they now stand for the prototypical case, namely for the major heterochromatic regions of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*, and more especially for Xh and Y.

It appears that the cardinal beliefs concerning these elements, subscribed to or held by many, are three in number. *First*, these regions show heteropycnosis of a permanent type. *Second*, they possess little genetical activity of the usual sort, lacking "major genes" with noticeable phenotypic effect or usual mutability; they are thus chiefly inert, and without large effect either when duplicated or deficient. *Third*, they possess, in some respect, a basically different structure from other ("euchromatic") chromosomal regions. This is reflected in their disproportionately large mitotic bulk despite low genic activity, their relatively small polytene bulk, and little-organized structure, their high breakability, and perhaps also, by their peculiar roles in variegation. Furthermore, for Xh and Y at least, meiotic crossing over is either vanishingly rare (as found by *Drosophila* workers) or startlingly excessive—that is, with nearly invariable formation of reciprocal exchanges in the male (as DARLINGTON believes)[1].

"Permanent" Heteropycnosis

Now the evidence for "permanent" heteropycnosis of Xh, Y, 2h, and 3h comes chiefly from their positive heteropycnosis in neuroblasts. In these, HEITZ (1933) and KAUFMANN (1934) have demonstrated the persistence of Xh, in part at least, and of Y, as positively heteropycnotic elements associated with the nucleolus in interphase, but not necessarily throughout interphase. However, as KAUFMANN claims, the heteropycnotic regions of the autosomes ordinarily are not densely staining until prophase in these cells, and in this respect they distinctively differ

[1] DARLINGTON (1958) still cherishes this belief. Any for whom it is an important idea will find the evidence for reciprocal chiasmata thoroughly examined, and new information presented in COOPER (1944, especially pp. 545—562; also 1945, 1946, 1949, 1950).

from Xh and Y which are visible at least in part during interphase. It is very likely that Xh and Y, and of course 2h and 3h, are not positively heteropycnotic throughout all of interphase, even in very large nuclei, or in the interphases of all cells. Thus large neuroblast nuclei are indeed found in which no sensible staining of heteropycnotic elements can be discerned. What is more, the situation in gonia, and in other mitotic cells does not support the view of permanent heteropycnosis for all of these heterochromatic elements. Thus HUETTNER (1933), RABINOWITZ (1941) and SONNENBLICK (1950) have all pointed to the occurrence during cleavage interphases of a stage at which no heteropycnotic element, indeed *no* "chromatin", is visible. Though it is likely that Xh, at least, is represented by heteropycnotic elements during growth stages of the oocytic nucleus (KING, RUBINSON and SMITH 1956), this is not so for the whole growth period of the spermatocyte. At early prophase of spermatocytes, fixed and stained with acetic carmine, acetic orcein, or after B15 or San Felice with Feulgen staining, three large flocculent masses, representing the paired homologs, are clearly discernible yet they do not show heavily condensed, heteropycnotic sites (COOPER 1950). Finally, at the polytene stage these regions may show the same basic, banded structures as the non-heteropycnotic regions (BRIDGES 1935). Thus the Y chromosome and the major heterochromatic regions Xh, 2h and 3h are not always positively heteropycnotic at interphasic and prophasic stages, and they furthermore may show differing patterns in their condensation in different cells, and especially in different kinds of cells. In some at least they cannot be differentiated from the euchromatic or isopycnotic elements against which they ordinarily stand so markedly in contrast at late telophase and early to mid prophase.

Genetic Activity, Absolute and Relative

Although it is decidedly the case that at least parts of Xh, 2(R)h, 2(L)h and 3(L)h, and very likely Y, do have relatively enormous mitotic bulks when compared with equivalent euchromatic sections, as MULLER and PAINTER (1932) and HEITZ (1933, 1934, 1935, 1956) first discovered, it is assuredly not so that these principal heterochromatic regions of *Drosophila melanogaster* lack "major genes" with noticeable phenotypic effects and usual mutability. Nor do they possess relatively little genetic activity per unit of chromonema as judged on the basis of polytene preparations.

Ordinarily bobbed is the only "major gene" listed for Xh, but among the free duplications of Xh worked with by LINDSLEY and SANDLER (1958) are four which prove WHITTINGHILL's suppressor of forked (su-f, locus 64.0) to be located in the heteropycnotic portion of Xh [namely dps (1;f) 3, 12, 52, 167]. With su-f definitely located in Xh, it is extremely

likely that one or more of the following also lie in Xh: short wing [sw 64.0; = an allele of WALLBRUNN's *l*(1)*tl*?], cleft (*cf.* 65.6), and bordered (bord, 66+). Xh therefore possesses at least two, and perhaps five (to eight or even more) known mutants of an ordinary sort[1].

SCHULTZ (in MORGAN, BRIDGES and SCHULTZ 1936, 1948) and BRIDGES (1942) have located light (lt, 55.0) in 2(L)h, and at 40F. SCHULTZ (in MORGAN, SCHULTZ and CURRY 1940, 1941) has demonstrated, particularly by means of the Minutes M(2)S2 and M(2)S4, that at least rolled (*lr*, 55.0-) and straw (stw, 55.1) are located in the chromocentral portion of 2(R)h, in 41A-41B. Whether any mutant is yet known for 3(L)h is uncertain, but a very likely candidate is inturned (in, 46.9; STURTEVANT 1943). This judgement is not to be taken as strong evidence however, for it is based on adjacency to the spindle fiber locus (47±) on the crossing over map, and on position effects, but not on a polytene analysis. Were such information to be given weight, then lightoid (ltd, 55.0; BRIDGES 1942) in 2L, perhaps apterous (ap, 55.4) and thick (tk, 55.3) in 2R, and radius incompletus (ri, 47.0) in 3L could also be adjudged likely residents within these basal heterochromatic regions (see HANNAH 1951). Thus the current minimal and likely higher numbers of known loci assignable to the autosomal heterochromatic regions are: 2(L)h from 1 to 2, 2(R)h from 2 to 4, and 3(L)h from 0 to 2.

Aside from the bobbed locus, possibly each of the poorly understood factors touched upon earlier (pp. 551—552), and perhaps an allele of *l*(1)*tl* (WALLBRUNN 1947), the known genes of Y consist of the members of the fertility complexes discovered by STERN (1929b). As mentioned above (p. 551), these have been estimated to consist of a set of at least 5 to 7 genes in each arm, of which at least one gene may have a homolog

[1] Information on these, and all other mutants for which specific references are not given, will be found in BRIDGES and BREHME (1944). I have omitted: Hooked veins (Hv, 66±) because of its association with an inversion, and bobbed-dominant (bb^D, 66±; LEFEVRE 1949) because it is not yet known to be independent of the bobbed locus. In addition, one or more factors affecting mitotic processes may lie in the region between IH and the proximal half of hC (Fig. 56). Thus spermatogenesis in X^i/O cysts of X^i/Y males seems distinctive when X^i possesses an inversion with a break in that interval of Xh. Should this prove regularly to be so, then the factors affecting male fertility cannot all be of the sort described by GOLDSCHMIDT (1955) as operating on sperm motility via secretions of the vas.

Now if all so far mentioned lie in Xh and none are alleles, then the eight referred to are: su-f, sw, *l* (1)*tl*, cf, Hv, bb^D, bb, and bord. But eight is quite possibly an ultra-conservative estimate for in addition, as commented earlier (pp. 551—552), Xh may also possess one or more K-alleles, and perhaps still other loci covered by Y^+ (*e.g.*, see LINDSLEY, EDINGTON, and VON HALLE 1958). What is more, FAHMY and FAHMY (1958) have listed six chemically-induced new mutants (kno, mel, wa^2, bz, ot, and mdg) which, by cited map locations, would be expected to fall adjacent or to the right of su-f. A very thorough re-investigation of the mutable elements in Xh is badly needed.

in Xh located near the bobbed locus (BESSMERTNAYA 1934; MULLER 1938; NEUHAUS 1938, 1939). Very likely these estimates are not wide of the mark, for the preliminary report of BROSSEAU's (1958. 1959) new investigation of the K-sets presents evidence for a linear array of at least 7 members in K_1 of Y^L, and at least 2 in K_2 of Y^S. There are thus not less than ten known mutable loci in Y (namely bobbed and 9 K-factors), and perhaps as many as 17 if all genetic attributes suspected in Y withstand analysis as loci[1].

Now the genes that are known to lie in the heterochromatic regions seem a rather ordinary lot, possessing among them no special characteristic that sets them apart. Their individual phenotypes (aside from those of the K-factors) are expressed as modifications of eye and integumentary colors, bristle length and shape, wing and wing vein details, and so on, and all appear—as is usual—to be pleiotropic. None seem excessively mutable or immutable, although bobbed, light, straw and radius incompletus are indeed each known in allelic series. Some geneticists may object that the K-factors represent a peculiar lot, but this objection will not bear scrutiny. Sperm motility (and vas physiology) is of course a striking and important phenotype, essential for survival of the species. Yet for visual detection it simply requires a microscopic examination which ordinarily is not routinely made. However, the K-factors do possess the common characteristic that their actions are most readily detectable in gametes. This of course provides no basis for concluding that, as genes, they differ in any notable manner from those affecting imaginal or larval attributes.

The question now remains whether, on a chromonematal basis, these heterochromatic elements are relatively impoverished genetic systems. As is well known the chromocentral basal portions of the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* generally appear disorganized, yet it does not seem well understood that with special effort preparations are nevertheless obtained which show banded structure within them of a sort quite comparable to that of other ("euchromatic") sections of the chromosomes (MULLER and PROKOFYEVA 1935; BRIDGES 1935, 1938;

[1] Discussion has been omitted of possible multifactorial systems in Y made up of genes having individual effects which are small when compared with the total non-heritable variation. In my judgement the experiments so far reported, and which are cited as proof for such systems in Y and Xh, are faulty and subject to alternative interpretation. Should the "polygenes" however prove to exist, then these genes would augment considerably the sum of those already discussed for, as others have pointed out, "oligogenes" and "polygenes" are not two kinds of gene, but they intergrade, differing chiefly by the methods used for their study; see: WADDINGTON (1943), FABERGÉ (1943), MATHER (1943) and, in a lighter vein, FABERGÉ and SINGLETON (1950); also footnote 2, p. 545 above.

PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1937a; BRIDGES and BRIDGES 1941a, b; P. N. BRIDGES 1941a, b, 1942). In table 2, for each element of *Drosophila melanogaster*, there is tabulated (i) the total number of loci listed in

Table 2. *The numbers of known loci (column* i*), total not-chromocentral polytene bands (*ii*), chromocentral polytene bands (*iii*), reference to authority (*iv*), and ratio r of total loci to total not-chromocentral bands for each of the elements of the haploid set of Drosophila melanogaster* (see text)

Element	(i) Known loci [a]	(ii) Total bands not-chrom.	(iii) Total bands chromocentr.	(iv) Refer.	(v) Ratio (r) loci bands
XL	141	1007	17	b	0.14
XR	0	?	?	c	—
2L	100	778	25	d	0.13
2R	87	1122	15	e	0.08
3L	93	855	29	f	0.11
3R	63	1178	0	g	0.05
4	12	135	?	h	0.10
Totals	496	5075	86+	—	0.10
Y_S	~(3—8)	?	~(8—10+)	i	—
Y_L	~7	?	~(8—10+)		—

a, BRIDGES and BREHME 1944; b, BRIDGES 1938; c, possibly 3 to 4 bands according to PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1937b; d, BRIDGES 1942; e, BRIDGES and BRIDGES 1939; f, BRIDGES 1941a; g, BRIDGES 1941b; h, SLIZYNSKY 1944; i, PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1935b, 1937a, b.

BRIDGES and BREHME (1944), (ii) the total number of not-chromocentral bands, (iii) the total number of chromocentral bands, (iv) the source for each datum, and (v) the ratio r of known loci to total not-chromocentral bands for each element. Omitting Y[1], and summing all loci as though every one lay *outside* of the chromocentral basal portions, an overall ratio of known loci to bands of 0.1 is obtained. Now this latter ratio, which is a conservative one for our purposes, gives a means for deciding whether or not the chromocentral lengths collectively are genetically impoverished, just as the ratios for each chromosome individually permit intrachromosomal tests of possible genetic poverty within a chromocentral region. Thus, in table 3, there are listed (i) the minimal numbers of loci known to reside in each chromocentral element,

[1] Admittedly the reported polytene structure of Y can be accepted only with great reservation, and it may be that renewed analysis will disclose many more bands than the 8 to 10+ now reported (PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1935b, 1937a, b). Yet even should they prove as many more than twice the number now held to comprise all of Xh, say as many as 60, the minimal mutant to band ratio of 0.17, and mutation coefficient of 6, would far exceed those estimated by SCHULTZ (in MORGAN, SCHULTZ and CURRY 1940) for the euchromatic interval 42A to 44A. Just as with 2h, 3h, and Xh, the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* is a heterochromatic element that is *not* characterized by genetic poverty or inertness.

(iii) the number of recorded bands in that element, (iv) the ratio r of known loci to bands in each chromosomal element, and (v) the probabilities (P_{min}) that as few or fewer loci would be found within so many bands were the over-all frequency of discovered loci to bands (i.e., r) the same as that for the "euchromatic" regions. Similarly there is also given (ii) the totals of the known *plus* other loci probably located in the heterochromatic elements, and (vi) the corresponding probabilities

Table 3. *The minimal number of known loci (column* i*), the possible number of known loci (*ii*), the numbers of chromocentral bands (*iii*), and the ratio r of total loci to not-chromocentral polytene bands (see table 2) for major chromosomal arms of Drosophila melanogaster*

If the ratio of loci to bands in the chromocentral regions were the same as r for that limb, then the likelihoods of finding as few or fewer loci within such a set of chromocentral bands is given for the minimal numbers of known loci (P_{min}, column v) and for the higher possible numbers of known loci (P_{max}, vi). So far as now known, loci within the chromocentral regions do not appear to be conspicuously more rare in relation to bands than in the not-chromocentral parts of the chromosomes (see text).

Elements	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(v)	(vi)
	Known loci		Number of Bands	Ratio (r) of loci/bands	P_{min}	P_{max}
	Minimum	Possible				
Xh	2	5+	17+	0.14	0.57	0.97
2(L)h	1	2	25	0.13	0.14	0.35
2(R)h	2	4	15	0.08	0.89	0.99
3(L)h	0	2	29	0.11	0.03	0.37
Totals	5	13	86+	0.10	0.13	0.98

for these likely numbers (P_{max}). The conclusion that may be drawn from this table is that the frequency of known loci to numbers of bands within a region is very likely similar both inside and outside the chromocentral elements; that is, Xh, 2(L)h, 2(R)h, 3(L)h, and Y, as represented in the polytene chromosome, are not noticeably impoverished genetically when compared with the euchromatic elements as a whole. Indeed there seems to be on the average about as many genes located in these heterochromatic regions as within a comparable section of a "euchromatic" length of polytene chromosome. These regions are therefore *not* inert, nor do they lack "major genes"[1].

[1] It cannot be emphasized too strongly, as the above facts bear out, that it is not in principle possible for the geneticist "to predict the genetically active and inert regions of the chromosome set from a rapid cytological examination of his material instead of having to wait for the results of a complete genetical analysis", as a leading cytologist maintains. Regrettably, many such "predictions" have been made and now circulate as uncontested fact.

An Interpretation of the Cytological Organization of the Major Heterochromatic Regions

Now many of the morphological distinctions that are commonly drawn between the basal heterochromatic regions and the remaining euchromatic regions of polytene chromosomes are in a sense illusory, as has already been suggested above, for they probably reflect much more of a behavioral peculiarity than any fundamental difference in the nature of the chromonematal lengths comprising them. Although it may be granted that poorly- or non-banded, compact or diffuse, often chromocentral, configurations are typically assumed by the major mitotic heteropycnotic regions in the polytene state, these are but some of the morphological states assumable by these regions. Another state attainable by them is evidently closely similar or even indistinguishable from that of a typical euchromatic region in the polytene chromosome. Conversely, standard euchromatic regions of polytene chromosomes may normally, or by induction, attain one or more polytene configurations similar to or perhaps identical with those regarded as distinctive of the basal regions which are strongly heteropycnotic in gonial or neuroblastic prophases. It would seem, then, that the polytene heterochromatic and polytene euchromatic states are in principle interconvertible so far as the cytological configuration is concerned, a point which PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA (1937b, 1941, 1946a, 1947) has strongly urged without, however, providing fully convincing experimental evidence.

SCHULTZ (1941a, b) early claimed that when a euchromatic polytene region normally remote from a heterochromatic sector is placed adjacent to it, the euchromatic bands newly juxtaposed to "heterochromatin" may themselves become "heterochromatinized", that is, cytologically transformed in the direction of, or to, a heterochromatic state. Similarly PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA (op. cit.) holds that when lengths of Xh are newly placed adjacent to ordinarily remote, and normally euchromatic sections [as in the cases of Ins(1) w^{m4}, rst^3, and sc^8], instances are found in which the Xh-region of the polytene chromosome becomes "almost euchromatic", as well as other cases in which the involved region of Xe becomes disorganized and similar in morphology to a heterochromatic length. More convincing, perhaps, are those sections in the polytene chromosomes of *Rhynchosciara* in which a pronounced heterochromatic structure is assumed in the nuclei of Malpighian tubule cells, but not necessarily in salivary gland cells where these regions may be similar to "euchromatin" (PAVAN and BREUER 1952). Again, DOBZHANSKY (1944) finds that in the salivary gland cells of *Drosophila pallidipennis* "the boundary between the hetero- and euchromatic sections of X is variable: many discs that appear euchromatic in some cells are heterochromatic in other cells", and this seems also to be the case for 2(R)h in *D. melano-*

gaster (SCHULTZ, in MORGAN, SCHULTZ and CURRY 1940). Unless the heteropycnotic region 3(R)h in *D. melanogaster* is represented by only a proximal band or interband, it too must have a perfectly typical euchromatic structure, not even being included in the chromocenter, to judge from the figures and descriptions of BRIDGES (1935) and P. N. BRIDGES (1941 b). Without arguing the merit of HEITZ' (1934 b) and FUJII's (1936, 1942) interpretations of α- and β-heterochromatin in *Drosophila virilis*, whatever the interpretation given to the cytological observations, it must be concluded that either some regions which are heteropycnotic at mitotic prophase are *not* heterochromatic in the polytene chromosome (e.g., at least part of the bases of chromosomes 3 and 6), or that those regions which are β-heterochromatic in the salivary gland chromosomes (and cytologically equivalent in structure to the major heterochromatic regions of the polytene chromosomes of *D. melanogaster*) are not heteropycnotic in all mitotic chromosomes. Finally, and most elegant and convincing of all, are those demonstrations by KRIVSHENKO (1950, 1952) for the major length of the Y chromosome of *Drosophila busckii*, and by WOLF (1956, 1957, 1958) for the X chromosome of *Phryne cincta*. In each case a major portion of the chromosome may be either "heterochromatic" (and extremely strikingly so, even to the point of invisibility in the case of *D. busckii*) in the polytene state or, depending upon environmental circumstances, full blown into an element with classical polytene "euchromatic" structure over at least a major portion of its length, although perhaps possessing or retaining proportionately little DNA in *D. busckii*. There seems very good reason, therefore, to suppose that the basic chromonematal structure, at whatever level of organization is required to give the characteristic band-interband polytene configuration referred to as "euchromatic", is alike along the chromonema and in this respect there is no fundamental distinction to be made between "heterochromatin" and "euchromatin". In principle, then, polytene "heterochromatin" and "euchromatin" may be regarded as alternative chromosomal states that reflect not underlying unique major structural peculiarities of the chromonemata, but rather portray within one nucleus and chromosome different conditions or behavior on the part of different regions within one chromosome.

As commented earlier (p. 556), less than 3% of the known bands of the polytene X chromosome lie in Xh and, so far as can be told, somewhat smaller percentages of bands lie within the identified polytene equivalents of 2h and 3h. Now the bands of the polytene heterochromatic regions are comparable in dimensions to those elsewhere, and a replication of strands and at least some lengthening or longitudinal growth must also occur in these regions when they are transformed to the polytene state. Nevertheless, as Xh comprises from 30 to 50% of the

mitotic metaphase X chromosome, and as at least parts of 2h and 3h each constitute about 20% of the bulk of their respective chromosomes, it follows that their transformations to the polytene state differ in at least one step from that of most other chromosomal regions. If, as it now seems reasonable to suppose, the basic chromonematal structure is the same in the major heteropycnotic regions as elsewhere, and with a similar gene to band ratio, then some additional components not essential to the chromonema, at least in such volume, must make up from 85 to 95% or so of the bulk of the heteropycnotic regions at mitosis. It is precisely in this sense that the major heteropycnotic regions of the mitotic chromosomes are *relatively inert*, as MULLER and his colleagues have long insisted (MULLER and GERSHENSON 1935; MULLER and PROKOFYEVA 1935; MULLER 1944b; etc.). Although gene-to-band ratios are similar in the polytene chromosome in both heterochromatic and euchromatic lengths, and accordingly these regions may become essentially equivalent in potential "genic activity" per unit of length in the polytene chromosome, there are necessarily relatively fewer genes per measure of mitotic length or bulk in the major heteropycnotic regions than elsewhere. At mitosis, then, the genes of the major heteropycnotic regions are amid a disproportionate mass of accessory material, or "Ballastsubstanz", and it is this and not merely their heteropycnosis that sets these regions apart from most at mitosis in *Drosophila melanogaster* and which needs interpretation. One possible explanation is that, relatively speaking, these regions are essentially mitotic "puffs", the chromonemata at these levels being axially and disproportionately interladened and encrusted with auxiliary material, remaining so even while heteropycnotically condensed and coiled.

As has been shown so well by recent investigations, sectors of polytene chromosomes that are known to give "puffs", "bulbs", or other specializations by differential accretional growth, may do so in a very cell- or tissue-specific manner (BEERMANN 1952, 1956; MECHELKE 1953, 1958; BREUER and PAVAN 1955; PAVAN 1958; PAVAN and BREUER 1955a, b), the puffing somehow reflecting nuclear function or a cellular state. Moreover, the derived puffed condition need not be final once achieved, for in *Acricotopus* (MECHELKE 1953, 1958) and in two species of *Rhynchosciara* (PAVAN and BREUER 1955a, b; PAVAN 1958), at least certain regions that have given rise to bulbs may thereafter revert to an ordinary polytene structure. Whether in any case a specific gene product is associated with a developing or completed puff is not established, but DNA, RNA and protein have been identified as accumulating in puffing regions (BREUER and PAVAN 1955; PAVAN and BREUER 1955b; RUDKIN 1955; FICQ and PAVAN 1957; RUDKIN and CORLETTE 1957; PAVAN 1958), and the new accumulations or "Ballastsubstanz" may occur in

both bands and interbands. Were a comparison to be made of the ratios of included numbers of non-allelic genes to volume between an extreme puff and an average unpuffed sector of equal bulk (or indeed between the puffed sector with its unpuffed state), it is obvious that the puff would then appear to be a "relatively inert" target, and for exactly the same reasons as urged above in explanation of the major heteropycnotic regions.

It is perhaps worth noting at this point that the supposed new accretions need not be viewed as interstitial in the sense of being actually intercalated into the length of the chromonema itself. RIS' and CROUSE's (1945) interpretation of the band and interband structure of polytene chromosomes, for example, offers a perfectly suitable model not requiring an actual axial lengthening of the line of the helically coiled chromonema (even though RIS and CROUSE did in fact hold that the chromonema increases greatly by a "longitudinal growth of individual genes"). What would be required is an increase in the proportion or extent of chromonema that runs parallel to the length (or line) of a sub-chromatid at the expense of that (in RIS' and CROUSE's words) "weaving back and forth" across the girth of the sub-chromatid. The accessory materials would then be regarded as bringing to near uniform girth, by accretion or "encrustation", the chiefly lengthwise with the principally transverse runs of chromonema. Such regional accretions would be "interstitial" in that they would separate two sections of chromonema which ordinarily are nearly contiguous; they would not, however, interrupt or alter the continuity of the chromonema itself between the separated levels. Were the accreted materials to increase disproportionately and beyond some limit in a polytene chromosome, and with greater and greater lengthwise involvement of chromonemata, then a bandless puff such as POULSON and METZ (1938) describe would result from an initially banded segment. BEERMANN's and BAHR's (1945) description of the submicroscopic structure of a Balbiani ring in *Chironomus* is also consistent with such an interpretation.

A two-fold, overall interpretation of the major heteropycnotic regions of the chromosomes of *Drosophila melanogaster* may therefore be suggested. (1) As with positively heteropycnotic regions generally, they retain a compact structure at times that the other chromosomal regions are condensing or decondensing, or even at a typical interphase state. The heteropycnotic state as such is, as elsewhere, evidently one in which the elements of the chromatids are coiled, for relic coils are often plainly visible (and also in the Y chromosome) at least at prophase of the second meiotic division of spermatogenesis. However, such a retention of coiling, or precocious coiling, cannot by itself account for their disproportionately large bulks at mitosis as compared with their relatively

slight polytene extent. Consequently it is assumed (2) that at mitosis the chromonema in these regions is at least intermediate between the more extended polytene states and the ordinary mitotic states of most other chromosomal regions; that is, it possesses interstitial accretions of materials even during mitosis that on the average, are present in only minimal amounts along most of the mitotic chromonema, but which become abundant and provide for perhaps most of the growth in length during attainment of a full polytene state (see BUCK 1937; BRIDGES 1938; COOPER 1938). Although the original concept of very large individual blocks has been disproved for Xh (see pp. 556—561), and is probably unrequired for other h-regions, nevertheless at least some loci (and perhaps all) within these major mitotic heteropycnotic regions will necessarily seem to be associated with unusually large volumes of the chromosome's substance. Yet it must be emphasized that the development or retention of a disproportionate bulk within a region is not a sufficient condition for the mitotic heteropycnosis of a region (nor indeed is it even viewed as a requirement for heteropycnosis in the interpretation just given). Thus HINTON (1942) has given evidence that a region of $\leqslant 7+$ bands (he concludes 1 band) in the polytene chromosome just proximal to 40 E, and comprising less than 1% of the 2 L polytene limb, corresponds with the entire proximal, major heteropycnotic region that makes up approximately 20% of the 2 L arm of the condensed mitotic chromosome. In addition, a subadjacent region of the polytene chromosome (roughly 40 D to F), that is no more than 2% of the entire 2 L polytene limb, in turn constitutes approximately 25% of the isopycnotic ("euchromatic") part of 2 L at mitosis. Unusual bulk at mitotic metaphase, therefore, may characterize certain isopycnotic regions as well as the major heteropycnotic sites. Finally, it remains to be discovered whether the mitotic Y chromosome of *Drosophila melanogaster* has a disproportionately large bulk, as Xh assuredly does, or whether it bears the same proportion to the entire X chromosome at both the mitotic metaphase and full polytene states as KRIVSHENKO (1952) has found to be the case in *Drosophila busckii*.

Chromosomal Differentiation

To this point we have argued that the heteropycnotic and heterochromatic regions (or chromosomes) are not something apart, *sui generis*, or composed of a special "heterochromatin" in contrast to isopycnotic or euchromatic elements. Rather they represent but some among a number of alternative states which are assumed, either as a whole or regionally, by chromonemata and chromonematal bundles or their secondary or adventitial components. These alternative states may or may not be cyclic and of differing temporal periods. The same basic

chromosomal unit, then, is to be expected in both "heterochromatin" and "euchromatin", and RIS' (1957) findings with the electron microscope suggest that this may be the case. The chromonemata when in the more extreme differentiated states need neither lose their genes nor, in principle, need they be irreversibly altered. As surprising as it may seem, for example, even what appears to be the most highly evolved and differentiated of chromosomal forms—namely that of the polytene chromosome—may change back to a swarm of condensed chromosomes (BAUER 1938; BIER 1957, 1958). Nevertheless, in practice, reversibility of state might not be attainable within a given kind of cell.

It should be emphasized that I have avoided implying or construing identity among the states, say, of a positively heteropycnotic region at mitosis with that of the same (or included) chromonematal length when it is said to be heterochromatic in the polytene chromosome. They are commonly viewed alike, and at least in part represent events in a common genic length, but very likely they share few secondary functional or special morphological similarities and the particular condition of the one is not always the necessary antecedent of the other. It is very likely that the underlying significance of these changes in chromosomes and their parts is to be understood in relation to the functioning of genes and chromosomes in development, in differentiation, and in moment-to-moment cellular functions (i.e., the "synchronic", as WADDINGTON 1940 terms them) as well as those that bridge succeeding generations (the "diachronic").

Direct evaluation of cytogenetic findings has been employed (pp. 566—570) to show that Xh, Y 2h and 3h of the chromosomes of *Drosophila melanogaster* are neither inert nor basically different in chromonematal structure (at least in the polytene condition). Now comparative cytology also provides convincing instances that sections of chromosomes, or the chromosomes themselves, that are isopycnotic or euchromatic at one time, may be heteropycnotic or heterochromatic at another. Thus, in some plants such as *Agapanthus*, chromosomes are said to be heterochromatic near the kinetochore at meiosis, but not at mitosis (v. DARLINGTON 1937); the X in short-horned grasshoppers undergoes a "reversal of heteropycnosis", passing through an isopycnotic state in the gonia (WHITE 1954), and so on. Indeed it now seems commonplace that individual chromosomes or their parts may undergo marked differential transformations within a nucleus and among nuclei involving, as MATHER'S (1948) fine essay points out, changes through the elimination of whole chromosomes or their parts (see especially BEERMANN 1956), changes of replication (e.g., *v.* MELLAND 1942; WHITE 1948; KRACZKIEWICZ and MATUSZEWSKI 1958; etc.), and changes of manifestation which may include disparities between homologs in opposite sexes (e.g.,

v. SLIZYNSKI 1950; ARONSON, RUDKIN and SCHULTZ 1954; *perhaps* DOBZHANSKY 1958; etc.) or even within a sex, the homologs being of the same or of different strain origins (e.g., v. FUJII 1940; PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1946b; SCHRADER 1921, 1923; HUGHES-SCHRADER 1948; BROWN and BENNETT 1957; etc.). Indeed WENRICH (1916) early observed that heteropycnotic chromosomes differ from isopycnotic chromosomes in degree and chronology (i. e., "allocycly"), rather than by the kind of changes involved, and related views have been expressed by many in recent years (e.g., POULSON and METZ 1938; PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA 1941, 1946a, 1947; PONTECORVO 1944; RESENDE 1945; LINNERT 1955; PAVAN 1958; and others).

The heteropycnotic elements of *Drosophila melanogaster*, then, are held by me to be special instances of chromosomal differentiation having unusually long temporal periods. They are viewed as regions with normal, active genes, but the cycles of these regions and the accessory materials carried by them are imagined to be adjusted primarily to the times and manners of action of the genes lying within them. There is no suggestion at all that they are primarily composed of unique series of duplications having like-allocycly, as PONTECORVO (1944) supposes, and SCHULTZ (1948) has effectively disposed of that special interpretation. The degree to which deficiencies of Xh and Y, or their duplications, may be taken to indicate genetic inertness has surely been overestimated on the basis of their inflated mitotic volumes. On a polytene basis alone, such duplications and deficiencies are all quite small, or very small, and none can be said to have been put to discriminating test. In the case of the Y chromosome, and very possibly of at least part of Xh, we deal in fact with an essential genetic system that is specialized primarily with respect to the diachronic processes, namely the effective phenotype of the gamete. The Y is no more dispensible from the chromosome set in *Drosophila melanogaster* than is the X itself, or indeed any or all of the autosomes. Temporally its cycles may remove it from specific action except in certain somatic tissues or in some diploid phase earlier than the spermatid (STERN and HADORN 1938). The Y is in fact a specialized chromosome, with a specialized and essential function. In no manner is it to be considered "inert", "accessory", "dispensible" or the potential "seat of the unorthodox" simply because it exhibits such pronounced heterochromaty, and because it is not required for the normal external phenotype of the adult male and female.

The heteropycnotic and heterochromatic regions assuredly are replicated in normal mitoses, and for most if not all of them this involves a period of at least relative decondensation. If most genes chiefly act metabolically during an uncondensed state of the chromosomes (as STERN 1938; and others have argued), then any genic region within a

given nucleus and cell may in principle remain genically active, yet in practice not be so, provided that replication time or phase is not concordant with the requirements of the primary actions of the genes within it. In such manner, if different chromosomal regions have unique periods of action, different cycles, and differing threshholds for response, nuclear mechanisms of differentiation may well lie in what may be regarded as a kind of "programmed" response to prior genically or environmentally determined cytoplasmic change. We may now be speaking of heteropycnosis or heterochromaty when the responses of the chromosomes result in easily detectable and visible physical changes in their morphology. It would perhaps be valuable to make a precise study of the linear peculiarities shown by each chromosome of a set in development of the zygote, in the differentiating tissues, and so on, for nuclei may have specific, characteristic patterns in different tissues as BEERMANN (1956) has discussed. Surely such a view makes conceivable a differentiation or restriction of the periods of activity and inactivity of genes within a genome, yet without the loss of any genes at all. Some variegation (*v.* COOPER 1956), for example, may be brought about when genes newly intercalated into a heterochromatic region are thereafter only statistically exposed and in different cells to the conditions their actions require. They need not be lost or destroyed as some have suggested. What is more, alleged cases of "nucleic acid starvation" and induced heterochromaty may be regarded as rather expected sorts of cytologic phenocopy. Finally, if advancing cytoplasmic change and differentiation cue such determinate changes in chromosomes, then in a sense the chromosomes may come visibly to reflect a record, or "memory", of their past history during development and differentiation of the zygote, when the changes are large. These records may refer back to single events or to longer sequences of past conditions. Some chromosomal differentiations may be reversible in a relatively simple manner, others may require essentially a reversal of at least a part of their ontogenetic history, a traverse backwards through time, if they are to return to the point or state of their initial departure. In the latter case they would appear to be irreversibly changed in their genetic competency by most ordinary tests. Perhaps some such events as these underlie the loss of full genetic competence which MOORE (1958a, b) finds in his very significant nuclear transplantation experiments, and which he has tentatively interpreted as brought about by an abnormal replication of genes.

Acknowledgment. In considering the problems with which this paper deals I could not have been more fortunate, for the help, advice, and lively criticism by Professors H. J. MULLER and CURT STERN, and by Drs. DAN LINDSLEY and JACK SCHULTZ, were always freely given me. To them, and especially to my onetime laboratory companion, Dr. JAKOV KRIVSHENKO, I offer grateful acknowledgment for kindnesses that go far beyond those that might be expected of a fellow scientist.

Summary and Conclusions

1. The heteropycnotic right half of the X chromosome (Xh) is segmented into four major elements at prophase in giant neuroblast cells. Each of these components (hA to hD) is in turn very likely composite, and each serves as a landmark permitting a more exact mapping of breakpoints, genetic loci, and sites of meiotic conjunction.

2. Breakpoints of some thirteen heterochromatic rearrangements, locations of kinetochore, blocks A and B′, bobbed$^+$, the locus of the nucleolus organizer, and the euchromatic-heterochromatic junction are plotted on a cytogenetic map of Xh, along with tentative estimates of assignments on BRIDGES' polytene map (*v.* Fig. 56). It is possible that BRIDGES' polytene map is deficient at its rightmost end.

3. The heterochromatic half of X is breakable at many points, and the portions so far separated make it unlikely that any fraction of Xh greater than 7 or 8% of the total metaphase length of X can be in the form of "an indivisible" block.

4. Nevertheless as MULLER contends, Xh and the other major heterochromatic regions do not contain as many genes per unit of *mitotic* length and volume as does a corresponding euchromatic length on the average. However, disparate mitotic bulk is neither a sufficient nor a necessary condition for heteropycnosis, as at least one isopycnotic region is evidently similarly inflated at mitotic metaphase. Though not proved, "α-heterochromatin" may denote regions which remain heteropycnotic during the polytene state and which do not possess an unusual mitotic bulk. Unusual volume at mitosis may be viewed as a mitotic "puff", analogous to a polytene puff.

5. Chromatids of major heteropycnotic or heterochromatic regions are very likely coiled at mitosis just as elsewhere along the chromosome, but the chromonemata within them may be relatively less coiled per unit length than those of a corresponding, unpuffed, isopycnotic length. Excess volume is believed to be derived from accessory materials accreted or secreted by a relatively small number of genes, as MULLER supposes.

6. The Y chromosome also shows an unsuspected morphologic complexity in the prophases of giant neuroblasts, but it has not so far been possible to homologise exactly any morphologic part of Y with that of Xh.

7. It is shown that the bobbed locus in Xh lies close to the nucleolus organizer, and quite likely it lies proximal to the nucleolus organizer. There is no certain proof of the physical and genetical location of the bobbed locus in Y at this time, but bobbed *probably* lies in the short arm of Y. There is no satisfactory evidence that, in addition to the bobbed$^+$ locus, a second "abnormal" or extreme bobbed locus is located in Y (more specifically, in Y^L). The gross features of the cytogenetic map of Y are discussed, as are the sources of ambiguity and the very considerable difficulties of localizing bobbed in Y.

8. Only the most distal fertility factor of the set in each arm need lie distal to any sites of frequent exchange between Xh and Y; furthermore the distal fertility factor in each arm must lie at an interstitial point and not terminally.

9. No portion of the heterochromatic half of X, including the right arm of X, can be eliminated as a possible site of exchange with Y at this time. So far as Y is concerned, only the distal extremity of Y^S, and of Y^L distal to segment LA, lack evidence consistant with exchange within them. Potentially, then, a large number of points of possible exchange between Xh and Y exist. Furthermore, evidence for reversed pairing and reversed crossing over of Xh with Y is unsatisfactory, and subject to more conventional interpretation.

10. The heterochromatic elements Xh, Y, 2h and 3h are not genetically inert or permanently heteropycnotic, nor is it likely that their chromonemata are notably depauperate in genes. So far as the evidence goes, each is as densely populated with mutable genes as an average corresponding chromonematal length from the euchromatic or isopycnotic remainder. Very likely this is true even for the proximal region in each arm of Y.

11. Thus "heterochromatin" is not to be viewed necessarily as evolutionarily degenerated "euchromatin". Rather it is suggested that the major heteropycnotic and heterochromatic regions are specialized elements, having exceptionally long periods of relative condensation, most or many genes of which act only at particular points of development or in particular tissues. The Y, for example, is not a degenerate chromosome, but a highly specialized genetic system many genes of which are essential for survival of the species because their actions uniquely confer functional capacity upon the spermatozoa.

12. The manner in which chromosomes may become differentiated during ontogeny is briefly discussed, and the suggestion is made that tissue-specific heterochromaty, heteropycnosis, or similar processes, of shorter cycles than those of the major heteropycnotic regions, may underly orderly changes in the competence of nuclei.

Literature Cited

ARONSON, J. F., G. T. RUDKIN and J. SCHULTZ: A comparison of giant X chromosomes in male and female *Drosophila melanogaster* by cytophotometry in the ultraviolet. J. Histochem. Cytochem. **2**, 458—459 (1954).

BAKER, J. R., and H. G. CALLAN: Heterochromatin. Nature (Lond.) **166**, 227—228 (1950).

BAKER, W. K.: On the structure of the $sc^8 \cdot Y$: bw^+ chromosome of *Drosophila melanogaster*. Dros. Inf. Serv. **29**, 101—103 (1955). — Induced loss of a ring and a telomeric chromosome in *Drosophila melanogaster*. Genetics **42**, 735—748 (1957).

—, and J. B. SPOFFORD: Heterochromatic control of variegation in *Drosophila melanogaster*. Proc. X. Int. Congr. Genetics, Montreal **2**, 11—12 (1958).

BARIGOZZI, C.: A general survey on heterochromatin. Port. Acta Biol. (R. B. GOLDSCHMIDT-Vol.) 593—620 (1950). — Neue Aufgaben über den Einfluss von in Euchromatin und Heterochromatin liegenden Genen auf die Zellgröße bei *Drosophila melanogaster*. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **27**, 142—146 (1952).

—, and A. DI PASQUALE: Heterochromatic and euchromatic genes acting on quantitative characters in *Drosophila melanogaster*. Heredity **7**, 389—399 (1953).

BAUER, H.: Die polyploide Natur der Riesenchromosomen. Naturwiss. **26**, 77—78 (1938).

BEERMANN, W.: Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. Chromosoma (Berl.) **5**, 139—198 (1952). — Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. **21**, 217—232 (1956).

—, and G. F. BAHR: The submicroscopic structure of the Balbiani ring. Exp. Cell Res. **6**, 195—201 (1954).

BESSMERTNAYA, C. L.: Abstract of work with N. P. DUBININ on the mutation process in the Y chromosome. Biol. Zh. **3**, 221 (1934).

BIER, K.: Endomitose und Polytänie in den Nährzellkernen von *Calliphora erythrocephala* MEIGEN. Chromosoma (Berl.) **8**, 493—522 (1957). — Beziehungen zwischen Wachstumsgeschwindigkeit, endometaphasischer Kontraktion und der Bildung von Riesenchromosomen in den Nährzellen von *Calliphora*. Z. Naturforschg. **13** b, 85—93 (1958).

BREUER, M. E., and C. PAVAN: Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Chromosoma (Berl.) **7**, 371—386 (1955).

BRIDGES, C. B.: Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. Genetics **1**, 1—52, 107—163 (1916). — Constrictions in the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Biol. Zbl. **47**, 600—603 (1927). — Salivary chromosome maps, with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. **26**, 60—64 (1935). — A revised map of the salivary gland X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. **29**, 11—13 (1938).

—, and K. BREHME: The mutants of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Washington, Pub. 552. vii + 257 pp, 1944.

—, and P. N. BRIDGES: A new map of the second chromosome. A revised map of the right limb of the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. **30**, 475—476 (1939).

BRIDGES, P. N.: A revised map of the left limb of the third chromosome of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. **32**, 64—65 (1941a). — A revision of the salivary gland 3R-chromosomal map of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. **32**, 229—300 (1941b). — A new map of the salivary gland 2L-chromosome. J. Hered. **33**, 403—408 (1942).

BROSSEAU, G. E.: An analysis of the fertility factors on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. Semiannual Rept., Biology Division, Oak Ridge National Lab., 4 pp., 1958. — Genetic analysis of the male fertility factors on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. Genetics (submitted, 1959).

BROWN, S. W., and F. D. BENNETT: On sex determination in the diaspine scale *Pseudaulacaspis pentagona* (TARG.) *(Coccoïdea)*. Genetics **42**, 510—523 (1957).

BUCK, J. B.: Growth and development of the salivary gland chromosomes in *Sciara*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **23**, 423—428 (1937).

COOPER, K. W.: Concerning the origin of the polytene chromosomes of *Diptera*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **24**, 452—458 (1938). — Analysis of meiotic pairing in *Olfersia* and consideration of the reciprocal chiasmata hypothesis of sex chromosome conjunction in male *Drosophila*. Genetics **29**, 537—568 (1944). —

Normal segregation without chiasmata in female *Drosophila melanogaster*. Genetics **30**, 472—484 (1945). — The mechanism of non-random segregation of sex chromosomes in male *Drosophila miranda*. Genetics **31**, 181—194 (1946). — The evidence for long range specific attractive forces during the somatic pairing of dipteran chromosomes. J. exp. Zool. **108**, 327—335 (1948). — The cytogenetics of meiosis in *Drosophila*. Mitotic and meiotic autosomal chiasmata without crossing over in the male. J. Morph. **84**, 81—122 (1949). — Normal spermatogenesis in *Drosophila*. In: Biology of *Drosophila*, edit. M. DEMEREC, p. 1—61. New York: Wiley & Sons 1950. — Attached-X's of exceptional origin involving misdivision, exchange between arms of X, or implausible double exchanges. Dros. Inf. Serv. **26**, 96 (1952a). — On the location of y^+ and ac^+ in $sc^8 \cdot Y$. Dros. Inf. Serv. **26**, 97 (1952b). — Studies on spermatogenesis in *Drosophila*. Amer. Phil. Soc. Yrbk (1951), p. 146—147. 1952c. — Phenotypic effect of Y chromosome hyperploidy in *Drosophila melanogaster*, and their relation to variegation. Genetics **41**, 242—264 (1956). — A probable heterochromatic deficiency in $In(1)sc^{L8}$, the approximate location of bobbed, and the size of block A. Dros. Inf. Serv. **32**, 118—119 (1958).

DARLINGTON, C. D.: Recent Advances in Cytology, 2nd edit., xvi + 669 pp. Philadelphia: Blakiston 1937. — The origin of iso-chromosomes. J. Genet. **39**, 351—361 (1940). — Nucleic acid and the chromosomes. Symp. Soc. Exp. Biol. **1**, 252—269 (1947). — The Evolution of Genetic Systems. 2. edit., xii + 265 pp. London: Oliver and Boyd 1958.

DOBZHANSKY, T.: Studies on chromosome conjugation. I. Translocations involving the second and the Y-chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **60**, 235—286 (1932a). — Cytological map of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. Biol. Zbl. **52**, 493—509 (1932b). — Distribution of heterochromatin in the chromosomes of *Drosophila pallidipennis*. Amer. Naturalist **78**, 193—213 (1944). — The X-chromosome in the larval salivary glands of hybrids *Drosophila insularis* × *Drosophila tropicalis*. Chromosoma (Berl.) **8**, 691—698 (1958).

DUBININ, N. P., and M. A. HEPTNER: A new phenotypic effect of the Y chromosome in *Drosophila melanogaster*. J. Genet. **30**, 423—446 (1935).

FABERGÉ, A.: The concept of polygenes. Nature (Lond.) **151**, 643 (1943).

—, and J. R. SINGLETON: A new treatment of genetics. J. Hered. **41**, 67—70 (1950).

FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Report of new mutants. Dros. Inf. Serv. **32**, 67—78 (1958).

FICQ, A., and C. PAVAN: Autoradiography of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Nature (Lond.) **180**, 983—984 (1957).

FUJII, S.: Salivary gland chromosomes of *Drosophila virilis*. Cytologia (Tokyo) **7**, 272—275 (1936). — An abnormal staining capacity of the sixth salivary gland chromosome of *Drosophila virilis*. Cytologia (Tokyo) **10**, 294—301 (1940). — Further studies on the salivary gland chromosomes of *Drosophila virilis*. Cytologia (Tokyo) **12**, 435—459 (1942).

GERSH, E. S.: Influence of temperature on the expression of position effects in the scute-8 stock of *Drosophila melanogaster* and its relation to heterochromatization. Genetics **34**, 701—707 (1949).

GERSHENSON, S. M.: Studies on the genetically inert region of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Behavior of an X-chromosome deficient for a part of its inert region. J. Genet. **28**, 297—313 (1933). — The nature of so-called genetically inert parts of chromosomes. Vid. Akad. Nauk URSR., Kiev 1940, 116 p. (In Russian; English translation by Eugenia Krivshenko.)

GOLDSCHMIDT, R. B.: Heterochromatic heredity. Hereditas (Lund) Suppl., 244—255 (1949). — Theoretical Genetics, x + 563 pp. Berkeley: University California Press 1955.

HANNAH, A.: Localization and function of heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. Advanc. Genet. **4**, 87—125 (1951).

—, and C. STERN: Mutation of fertility factors in the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. Dros. Inf. Serv. **26**, 104—105 (1952).

HEITZ, E.: Das Heterochromatin der Moose I. Jb. wiss. Bot. **69**, 762—818 (1928). — Heterochromatin, Chromozentren, Chromomeren. Ber. dtsch. bot. Ges. **47**, 274—284 (1929). — Die Herkunft der Chromozentren. Planta (Berl.) **18**, 571—636 (1932). — Über totale und partielle somatische Heteropyknose, sowie strukturelle Geschlechtschromosomen bei *Drosophila funebris*. Z. Zellforsch. **19**, 720—742 (1933a). — Die somatische Heteropyknose bei *Drosophila melanogaster* und ihre genetische Bedeutung. Z. Zellforsch. **20**, 237—287 (1933b). — Eine Beziehung zwischen der genischen und strukturellen Längsdifferenzierung des X-Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **67**, 216—217 (1934a). — Über α- und β-Heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromomeren bei *Drosophila*. Biol. Zbl. **54**, 588—609 (1934b). — Chromosomenstruktur und Gene. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **70**, 402—447 (1935). — Die Chromosomenstruktur im Kern während der Kernteilung und der Entwicklung des Organismus. In: Chromosomes (Lectures held at the Conference on Chromosomes, Wageningen), p. 5—25. 1956.

HINTON, T.: A comparative study of certain heterochromatic regions in the mitotic and salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Genetics **27**, 119—127 (1942).

HUETTNER, A. F.: Continuity of the centrioles in *Drosophila melanogaster*. Z. Zellforsch. **19**, 119—134 (1933).

HUGHES-SCHRADER, S.: Cytology of Coccids *(Coccoïdea-Homoptera)*. Adv. Genetics **2**, 127—203 (1948).

KAUFMANN, B. P.: Interchange between X- and Y-chromosomes in attached X females of *Drosophila melanogaster*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **19**, 830—838 (1933). — Somatic mitoses of *Drosophila melanogaster*. J. Morph. **56**, 125—155 (1934). — Nucleolus-organizing regions in salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Z. Zellforsch. **28**, 1—11 (1938). — Distribution of induced breaks along the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **25**, 571—577 (1939a). — Induced chromosome rearrangements in *Drosophila melanogaster*. J. Heredity **30**, 178—190 (1939b). — Reversion from roughest to wild type in *Drosophila melanogaster*. Genetics **27**, 537—549 (1942). — Cytology. Carnegie Inst. Publ. **43**, 115—120 (1944). — Chromosome aberrations induced in animal cells by ionizing radiations. In: Radiation Biology, vol. 1, p. 627—711. New York: McGraw-Hill 1954.

KHVOSTOVA, V. V.: The influence of the proximal chromosome regions on the position effect of the cubitus interruptus gene in *D. melanogaster*. Dros. Inf. Serv. **15**, 25 (1941).

KING, R. C., A. C. RUBINSON and R. F. SMITH: Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. Growth **20**, 121—157 (1956).

KRACZKIEWICZ, Z., and B. MATUSZEWSKI: Observations sur une structure atypique des chromosomes salivaires de certains cécidomyides. Chromosoma (Berl.) **9**, 484—492 (1958).

KRIVSHENKO, J.: The structure of the heterochromatic part of the Y-chromosome in *Drosophila buscki*. Proc. nat. Acad. Sci. **36**, 703—707 (1950). — A cytogenetic study of the Y chromosome in *Drosophila buscki*. Genetics **37**, 500—518 (1952). — $In_1(1)^K$, miniature 55 *l* 3. Dros. Inf. Serv. **30**, 75 (1956).

LAMY, R., and H. SLIZYNSKA: A spontaneous ring-shaped deletion in the Muller-5 chromosome. Dros. Inf. Serv. **24**, 83 (1950).

LEFEVRE, G.: bb^D: Bobbed-dominant (?). Dros. Inf. Serv. **23**, 58 (1949).

LEWIS, E. B.: The phenomenon of position effect. Advanc. Genetics **3**, 73—115 (1950).

LINDSLEY, D. L.: Spermatogonial exchange between the X and Y chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Genetics **40**, 24—44 (1955a). — Heterochromatic exchange between a reversed acrocentric compound X chromosome and the Y chromosome. Dros. Inf. Serv. **29**, 134 (1955b). — Spermatogonial exchange involving the X but not the Y chromosome in *Drosophila melanogaster*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 103—122 (1958).

— C. W. EDINGTON and E. S. VON HALLE: Sex-linked recessive lethal changes in *Drosophila melanogaster* suppressed by the Y chromosome. Proc. X. Int. Congr. Genetics, Montreal **2**, 172—173 (1958).

—, and L. SANDLER: The meiotic behavior of grossly deleted X chromosomes in *Drosophila melanogaster*. Genetics **43**, 547—563 (1958).

LINNERT, G.: Die Struktur der Pachytänchromosomen in Euchromatin und Heterochromatin und ihre Auswirkung auf die Chiasma-Bildung bei *Salvia*-Arten. Chromosoma (Berl.) **7**, 90—128 (1955).

MATHER, K.: Polygenes in development. Nature (Lond.) **151**, 560 (1943). — The genetical activity of heterochromatin. Proc. roy. Soc. B **132**, 308—332 (1944). — Significance of nuclear change in differentiation. Nature (Lond.) **161**, 872—874 (1948).

MECHELKE, F.: Reversible Strukturmodifikationen der Speicheldrüsenchromosomen von *Acricotopus lucidus*. Chromosoma (Berl.) **5**, 511—543 (1953). — The timetable of physiological activity of several loci in the salivary gland chromosomes of *Acricotopus lucidus*. Proc. X. Int. Congr. Genetics, Montreal **2**, 185 (1958).

MELLAND, A. M.: Types of development of polytene chromosomes. Proc. roy. Soc. Edinb. B **61**, 316—327 (1942).

MOORE, J. A.: Transplantation of nuclei between *Rana pipiens* and *Rana sylvatica*. Exp. Cell Res. **14**, 532—540 (1958a). — The transfer of haploid nuclei between *Rana pipiens* and *Rana sylvatica*. Exp. Cell Res. Suppl. **6**, 179—191 (1958b).

MORGAN, L. V.: Origin of attached-X chromosomes in *Drosophila melanogaster* and the occurrence of non-disjunction of X's in the male. Amer. Nat. **72**, 434—446 (1938).

— T. H., C. B. BRIDGES and J. SCHULTZ: Report of investigations on the constitution of the germinal material in relation to heredity. Carnegie Instn. Publ. **33**, 274—280 (1934); **34**, 284—291 (1935); **35**, 289—297 (1936).

— J. SCHULTZ and V. CURRY: Investigations on the constitution of the germinal material in relation to heredity. Carnegie Inst. Publ. **39**, 251—255 (1940); **40**, 282—287 (1941).

— A. H. STURTEVANT and C. B. BRIDGES: The constitution of the germ material in relation to heredity. Carnegie Inst. Publ. **25**, 308—312 (1926).

MULLER, H. J.: A gene for the fourth chromosome of *Drosophila*. J. exp. Zool. **17**, 325—336 (1914). — Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors. Genetics **3**, 422—499 (1918). — The remaking of chromosomes. Collecting Net **13**, 181, 183—195, 198 (1938). — The nonequivalence of the blocks and the salivary "heterochromatin". Genetics **30**, 15 (1944a). — The mechanism of chromosome breakage by irradiation. Amer. Phil. Soc. Yrbk. **1943**, 162—165 (1944b). — Tandem attached X's producing ring chromosomes. Dros. Inf. Serv. **18**, 57—58 (1944c). — The construction of

several new types of Y chromosomes. Dros. Inf. Serv. **22**, 73—74 (1948). — The use of rearranged X's and Y's in facilitating class work with *Drosophila*. Dros. Inf. Serv. **23**, 110—111 (1949). — The nature of the genetic effects produced by radiation. In: Radiation Biology, vol. 1, p. 351—473. New York: McGraw-Hill 1954. — The relation between chromosome changes and gene mutations. Brookhaven Symp. Biol. **8**, 126—147 (1956).

MULLER, H. J., and S. M. GERSHENSON: Inert regions of chromosomes as the temporary products of individual genes. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **21**, 69—75 (1935).

—, and I. HERSKOWITZ: Concerning the healing of chromosome ends produced by breakage in *Drosophila melanogaster*. Amer. Naturalist **88**, 177—208 (1954).

—, and T. PAINTER: The differentiation of the sex chromosomes of *Drosophila* into genetically active and inert regions. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **62**, 316—365 (1932).

—, and A. A. PROKOFYEVA: The structure of the chromonema of the inert region of the X-chromosome of *Drosophila*. C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS., N.S. **1**, 658—660 (1935).

— D. RAFFEL, S. M. GERSHENSON and A. A. PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA: A further analysis of loci in the so-called "inert" region of the X chromosome of *Drosophila*. Genetics **22**, 87—93 (1937).

—, and J. VALENCIA: Three scute alleles involving gross rearrangements. Dros. Inf. Serv. **21**, 69—70 (1947).

NEUHAUS, M. E.: Data concerning crossing over between the X and Y chromosomes in females of *melanogaster Drosophila* (sic!). C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS., N.S. **3**, 41—44 (1935). — Crossing-over between the X- and Y-chromosomes in the female *Drosophila melanogaster*. Biol. Zh. **15**, 63—73 (1936a). — Crossing over between the X- and Y-chromosomes in the female of *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **71**, 265—275 (1936b). — Production of attached X-chromosomes in *Drosophila melanogaster* males. Nature (Lond.) **137**, 996—997 (1936c). — Crossing-over in the bobbed region. Dros. Inf. Serv. **8**, 80 (1937a). — Additional data on crossing-over between X and Y chromosomes in *Drosophila melanogaster*. Genetics **22**, 333—339 (1937b). — A cytogenetic study of the Y-chromosome in *Drosophila melanogaster*. Biol. Zh. **7**, 335—358 (1938). — A cytogenetic study of the Y-chromosome of *Drosophila melanogaster*. J. Genet. **37**, 229—254 (1939).

NOUJDIN, N. I.: A study of mosaicism of the eversporting displacement type in *Drosophila melanogaster*. Bull. Biol. Méd. exp. **5**, 548—551 (1938). — The role of hybridization in variation. III. Influence of the Y-chromosome on the variability of the yellow and achaete loci in *Drosophila melanogaster*. Zh. obsh. Biol. **8**, 101—126 (1947).

NOVITSKI, E.: The compound X chromosomes in *Drosophila*. Genetics **39**, 127—140 (1954).

ÖSTERGREN, G.: Isopycnosis and isopycnotic, two new terms for use in chromosome studies. Hereditas (Lund) **36**, 511—513 (1950).

OSTER, I. I., and S. V. IYENGAR: A marked ring-Y. Dros. Inf. Serv. **29**, 159 (1956).

PARKER, D. R.: Radiation induced exchanges in *Drosophila* females. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **40**, 795—800 (1954).

—, and J. MCCRONE: A genetic analysis of some rearrangements induced in oocytes of *Drosophila*. Genetics **43**, 172—186 (1958).

PAVAN, C.: Morphological and physiological aspects of chromosomal activities. Proc. X. Int. Congr. Genetics, Montreal. (Preprint, 14 pp.) 1958.

—, and M. E. BREUER: Polytene chromosomes in different tissues of *Rhynchosciara*. J. Hered. **43**, 150—157 (1952). — Polytene chromosomes of "*Rhynchosciara milleri*" sp. n. *(Diptera, Mycetophilidae)*. Rev. bras. Biol. **15**, 329—339

(1954a). — Differences in nucleic acids content of the loci in polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* according to tissues and larval stages. Symp. on Cell Secretion (edit. G. SCHREIBER), Belo Horizonte, p. 90—99, University of Minas Gerais.

PHILIP, U.: Crossing-over between X- and Y-chromosomes in *Drosophila melanogaster*. J. Genet. **31**, 341—352 (1935).

PONTECORVO, G.: Structure of heterochromatin. Nature (Lond.) **153**, 365—367 (1944).

POULSON, D. F., and C. W. METZ: Studies on the structure of nucleolus-forming regions and related structures in the giant salivary gland chromosomes of *Diptera*. J. Morph. **63**, 363—395 (1938).

PROKOFYEVA, A. A.: Morphologische Struktur der Chromosomen von *Drosophila melanogaster*. Z. Zellforsch. **22**, 225—262 (1935).

PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA, A. A.: The structure of the chromocentre. C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS. **2**, 498—499 (1935a). — Y chromosome in salivary glands of *Drosophila*. C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS. **3**, 365—366 (1935b). — The structure of the chromocenter. Cytologia (Tokyo) **6**, 438—443 (1935c). — The structure of the Y chromosome in the salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Genetics **22**, 94—103 (1937a). — Observations on the structure of chromosomes in the salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Izv. Akad. Nauk SSSR., Otd. mat.-est., Ser. biol. **1937**b, 393—426 — Cytological study of the "simple breaks" in the inert region of the scute^8 chromosome of *Drosophila melanogaster*. Izv. Akad. Nauk SSSR., Otd. mat.-est., Ser. biol. **1939**, 349—361. — Cytological properties of inert regions and their bearing on the mechanisms of mosaicism and chromosome rearrangement. Dros. Inf. Serv. **15**, 34—35 (1941). — Heterocyclicity of the system of cell nucleus. C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS. **53**, 741—744 (1946a). — Heterocyclicity of the parental chromosome sets. C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS. **54**, 169—172 (1946b). — Heterochromatization as a change of chromosome cycle. J. Genet. **48**, 80—98 (1947).

RABINOWITZ, M.: Studies on the cytology and early embryology of the egg of *Drosophila melanogaster*. J. Morph. **69**, 1—49 (1941).

RAFFEL, D., and H. J. MULLER: Position effect and gene divisibility considered in connection with three strikingly similar scute mutations. Genetics **25**, 541—583 (1940).

RASMUSON, M.: Variation in bristle number of *Drosophila melanogaster*. Acta zool. (Stockh.) **33**, 277—307 (1952).

RESENDE, F.: Hétérochromatine. Port. Acta biol. **1**, 139—156 (1945).

RIS, H.: Chromosome structure. In: Chemical Basis of Heredity, edit. W. MCELROY and H. B. GLASS, p. 23—62. Baltimore: Johns Hopkins University Press 1957.

—, and H. CROUSE: Structure of the salivary gland chromosomes of Diptera. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **31**, 321—327 (1945).

RUDKIN, G. T.: The ultraviolet absorption of puffed and unpuffed homologous regions in the salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Genetics **40**, 593 (1955).

—, and S. L. CORLETTE: Disproportionate synthesis of DNA in a polytene chromosome region. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **43**, 964—968 (1957).

SCHRADER, F.: The chromosomes of *Pseudococcus nipae*. Biol. Bull. **40**, 259—271 (1921). — A study of the chromosomes in three species of *Pseudococcus*. Arch. Zellforsch. **17**, 45—62 (1923). — Die Geschlechtschromosomen. In Zellen- und Befruchtungslehre, Bd. 1, iv u. 194 S. Berlin: Gebrüder Borntträger 1928.

SCHULTZ, J.: The function of heterochromatin. Proc. 7. Int. Congr. Gen. 1939. J. Genet. Suppl., 257—262 (1941a). — The evidence of the nucleoprotein nature of the gene. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. **9**, 55—65 (1941b). — The gene as a chemical unit. In: Colloid Chemistry, edit. J. ALEXANDER, vol. 5, p. 819—850. 1944. — The nature of heterochromatin. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. **12**, 179—191 (1948). — Interrelations between nucleus and cytoplasm: problems at the biological level. Exp. Cell Res. Suppl. **2**, 17—42 (1952).

—, and D. G. CATCHESIDE: The nature of closed X-chromosomes in *Drosophila melanogaster*. J. Genet. **35**, 315—320 (1937).

—, and H. REDFIELD: Interchromosomal effect on crossing over in *Drosophila*. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 175—197 (1951).

SHARMA, A. K., and A. SHARMA: Recent advances in the study of chromosome structure. Bot. Rev. **24**, 511—549 (1958).

SLYZINSKI, B. M.: A revised map of salivary gland chromosome 4 of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. **35**, 322—324 (1944). — *Chironomus* versus *Drosophila*. J. Genet. **50**, 77—78 (1944).

SONNENBLICK, B. P.: The early embryology of *Drosophila melanogaster*. In: Biology of *Drosophila*, edit. M. DEMEREC, p. 62—167. New York: Wiley & Sons 1950.

STEINBERG, A. G.: Is a chromosomal aberration necessary for a position effect? Dros. Inf. Serv. **17**, 65 (1942).

STERN, C.: Eine neue Chromosomenaberration von *Drosophila melanogaster* und ihre Bedeutung für die Theorie der linearen Anordnung der Gene. Biol. Zbl. **46**, 505—508 (1926). — Ein genetischer und zytologischer Beweis für Vererbung im Y-Chromosom von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **44**, 187—231 (1927). — Über die additive Wirkung multipler Allele. Biol. Zbl. **49**, 261—290 (1929a). — Untersuchungen über Aberrationen des Y-Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **51**, 253—353 (1929b). — During which stage in the nuclear cycle do the genes produce their effects in the cytoplasm? Amer. Naturalist **72**, 350—357 (1938).

—, and E. HADORN: The determination of sterility in *Drosophila* males without a complete Y-chromosome. Amer. Naturalist **72**, 42—52 (1938).

—, and S. OGURA: Neue Untersuchungen über Aberrationen des Y-Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **58**, 81—121 (1931).

STONE, W. S., and I. THOMAS: Crossover and disjunctional properties of X chromosome inversions in *Drosophila melanogaster*. Genetica **17**, 170—184 (1935).

STURTEVANT, A. H.: The locus of *inturned*. Dros. Inf. Serv. **17**, 51 (1943).

TINIAKOV, G. G.: The inert regions and general morphology of the chromosomes in the salivary gland cells of *Drosophila*. Biol. Zh. **5**, 753—802 (1936).

VANDERLYN, L.: The heterochromatic problem in cytogenetics as related to other branches of investigation. Bot. Rev. **15**, 507—582 (1949).

WADDINGTON, C. H.: Organisers and Genes, xi and 160 p. Cambridge: Cambridge University Press 1940. — Polygenes and oligogenes. Nature (Lond.) **151**, 394 (1943).

WALLBRUNN, H. M.: *l*(1)*tl*: lethal (1) temperature limited. Dros. Inf. Serv. **21**, 71 (1947).

WENRICH, D. H.: The spermatogenesis of *Phrynotettix magnus* with special reference to synapsis and the individuality of the chromosomes. Bull. Mus. Comp. Zool. (Harvard College) **60**, 57—134 (1916).

WHITE, M. J. D.: The cytology of the *Cecidomyidae (Diptera)*. IV. The salivary-gland chromosomes of several species. J. Morph. **82**, 53—80 (1948). — Nucleus, chromosomes and genes. In: Cytology and Cell Physiology, edit. G. BOURNE, p. 183—231. London: Oxford University Press 1951. — Animal Cytology and Evolution, 2. edit., xiv and 454 p. Cambridge: Cambridge University Press 1954.

WOLF, B. E.: Nachweis eines lokalisierten Chromatidenstückaustausches im X-Chromosom von *Phryne cincta* mit Hilfe der Speicheldrüsenanalyse. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1956. Zool. Anz. Suppl., 284—297 (1957). — Temperaturabhängige Allozyklie des polytänen X-Chromosoms in den Kernen der Somazellen von *Phryne cincta*. Chromosoma (Berl.) **8**, 396—435 (1957). — Control of the crossing-over frequency in the X-chromosome of *Phryne cincta* by allocycly *(Diptera: Nematocera)*. Proc. X. Int. Congr. Genetics, Montreal **2**, 318 (1958).

Professor K. W. COOPER,
Department of Cytology, Dartmouth Medical School,
Hanover, New Hampshire (USA)